

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

DUBUC, Jean H.
GOUDREAU GAGE DUBUC &
MARTINEAU WALKER
The Stock Exchange Tower
800 Place Victoria, Suite 3400
P.O. Box 242
Montreal, Quebec H4Z 1E9
CANADA

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 25.10.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
AML/12616.12

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/CA99/00651

Date du dépôt international (jour/mois/année)
16/07/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
17/07/1998

Déposant
KEMESTRIE INC. et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Aperribay, I

Tél. +49 89 2399-8154



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire AML/12616.12	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/CA99/00651	Date du dépôt international (jour/mois/année) 16/07/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 17/07/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C08L5/08		
Déposant KEMESTRIE INC. et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 17 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/02/2000	Date d'achèvement du présent rapport 25.10.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Gerber, M N° de téléphone +49 89 2399 8528 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/CA99/00651

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-14	reçue(s) le	20/07/2000	avec la lettre du	14/07/2000
------	-------------	------------	-------------------	------------

Revendications, N°:

9-16	reçue(s) le	20/07/2000	avec la lettre du	14/07/2000
------	-------------	------------	-------------------	------------

1-8	reçue(s) le	29/09/2000	avec la lettre du	28/09/2000
-----	-------------	------------	-------------------	------------

Dessins, feuilles:

1/7-7/7	version initiale
---------	------------------

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/CA99/00651

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence au document suivant :

D1: US-A-5 620 706 (DUMITRIU ET AL.) 15 Avril 1997, cité dans la demande

1. Nouveauté

L'objet des revendications 1-16 est considéré comme nouveau par rapport à l'art antérieur disponible (Article 33(2) PCT).

En effet, D1 décrit une méthode de préparation d'un hydrogel par complexation de xanthane et de chitosane, utilisé pour immobiliser des composés biologiquement actifs, comme par exemple des **protéines et des enzymes**, qui sont ensuite relargués par diffusion. L'**activité biologique** de ces substances est ainsi préservée, voire augmentée (colonne 1, lignes 57-62). Par ailleurs, alors que l'activité enzymatique de la xylanase et de la protéase augmentent suite à l'immobilisation dans le gel de xanthane / chitosane, leur **stabilité thermique** augmente dans le premier cas et diminue dans le second (colonne 13, lignes 3-8).

La méthode de préparation de l'hydrogel consiste en l'ajout d'enzymes à une solution aqueuse de xanthane dans des concentrations allant de 0,5 à 1,8% en poids. La solution ainsi obtenue est alors agitée à 15°C pendant 15 minutes, et introduite au goutte à goutte, à l'aide d'une seringue, dans une solution de chitosane. Le pH de la solution est ensuite ajusté en fonction du type d'enzyme utilisé. Les microsphères ainsi obtenues sont agitées pendant 15 minutes à température ambiante (20-29°C) et lavées avec une solution tampon d'acétate (colonne 6, lignes 24-37).

L'hydrogel ainsi préparé peut être utilisé pour l'application de substances sur la peau, notamment au moyen de patches, car ce dernier est stable dans les domaines de pH physiologiques (colonne 12, lignes 57-62).

La différence entre la présente demande et D1 réside dans l'utilisation de vitamines,

acides aminés, acides nucléiques et tripeptides à la place des protéines et enzymes pour immobilisation dans l'hydrogel de xanthane et de chitosane.

2. Activité inventive

a. Une activité inventive peut être reconnue pour l'objet des revendications 1-7 (Article 33(3) PCT).

D1 est considéré comme l'art antérieur le plus proche.

Les compositions des revendications 1-7 diffèrent principalement de celles décrites dans D1 par le type de composé ajouté à l'hydrogel formé d'un complexe de chitosane et de xanthane.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme étant de trouver d'autres composés biologiquement actifs susceptibles d'être immobilisés par ledit hydrogel, celui-ci leur conférant une protection contre la chaleur et la lumière.

La solution de ce problème, proposée dans les revendications 1-7 est inventive.

L'hydrogel de D1 permet certes de préserver ou d'augmenter l'activité biologique des enzymes et protéines immobilisés (colonne 1, lignes 58-62). Il ne confère cependant pas la stabilité à la chaleur revendiquée dans la présente demande pour tous les types d'enzymes. Par exemple, en ce qui concerne la xylanase, à la fois la stabilité à la chaleur et l'activité enzymatique sont augmentées par immobilisation dans l'hydrogel de xanthane/chitosane. Quant à la protéase, l'activité enzymatique est maintenue par immobilisation dans l'hydrogel mais la stabilité thermique diminue (colonne 13, lignes 4-5).

D1 ne permet donc pas d'établir une tendance générale concernant l'effet de l'hydrogel sur la stabilité thermique des enzymes qui s'y trouvent immobilisés.

En outre, D1 mentionne l'utilisation du dit hydrogel comme support pour d'autres substances (médicaments, cellules eucaryote et procaryote, substances

pharmaceutiques polybasiques, colonne 7, lignes 2-38), permettant le relargage contrôlé de ces dernières, mais ne suggère aucunement une quelconque protection contre la chaleur et la lumière.

La personne du métier, constatant que des composés proches de par leur structure et leur activité présentent des comportements opposés à la chaleur lorsqu'ils sont inclus dans l'hydrogel de xanthane/chitosane, ne peut donc prévoir si des composés structurellement différents inclus dans ce même gel présenteront ou non une stabilité à la chaleur.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-7 ne relève pas d'une démarche technique évidente pour l'homme du métier et implique par conséquent une activité inventive (Article 33(3) PCT).

b. Les méthodes de synthèse des compositions thermo- et photostables des revendications 8-12 ainsi que les utilisations de compositions telles que revendiquées dans les revendications 14-16 sont donc également inventives.

3. Application industrielle

Le contenu des revendications 1-16 de la présente demande de brevet est susceptible d'application industrielle dans le domaine des compléments alimentaires et de la dermatologie (Article 33(4) PCT).

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

a. La revendication 1 n'est pas claire et ne satisfait pas aux conditions requises à l'article 6 PCT, dans la mesure où l'objet pour lequel une protection est demandée n'est pas clairement défini. Telle qu'elle a été spécifiée, la définition fonctionnelle "...hydrogel étant adapté à relarguer sur plusieurs heures ces dites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain." ne permet pas à l'homme du métier de déterminer quelles sont les caractéristiques techniques nécessaires audit relargage. Cette caractéristique est donc considérée comme descriptive.

b. L'expression "un solvant approprié" utilisé dans la description, à la page 3, ligne 14, est vague et n'est pas en accord avec la revendication 8 dans laquelle il est fait usage d'éthanol pour solubiliser les vitamines en question.

c. Etant donné que la formation d'un hydrogel implique la présence d'eau, les expressions "solution de xanthane" ou "solution de chitosane" dans les revendications 8 et 9, ainsi que dans la description (exemple 1) peuvent prêter à confusion du fait du manque de précision de leur définition.

d. Les conditions d'obtention des courbes de cinétique de libération ne peuvent figurer dans la description (page 12, lignes 13-16), car il n'existe pas de support dans la demande telle que déposée pour ces explications.

e. L'ajout d'une étape supplémentaire (e) à la revendication 8, concernant les actifs liposolubles, ainsi que dans la description, à la page 3, lignes 18-19, n'est pas acceptable.

En tant que telle, elle ne correspond en effet pas aux étapes décrites dans l'exemple 2.

De plus, à la page 5, lignes 13-18, il est uniquement précisé de quelle façon les ingrédients **actifs hydrosolubles** sont introduits dans l'hydrogel.

Le mode de réalisation de l'invention décrit dans l'exemple 2, page 6, se rapportant à l'inclusion d'une vitamine liposoluble par diffusion dans un hydrogel de xanthane/chitosane, n'est pas couvert par la revendication 8.

Ce défaut de concordance entre les revendications et la description laisse planer un doute sur l'objet pour lequel une protection est demandée. La revendication 8 n'est donc pas claire (article 6 PCT).

f. Les lettres de l'alphabet grec α et μ , présentes dans la demande originale, manquent dans l'ensemble de la description modifiée.

TITRE DE L'INVENTION

HYDROGELS POLYIONIQUES À BASE DE XANTHANE ET CHITOSANE POUR STABILISATION ET RELARGAGE CONTRÔLÉ DES VITAMINES

5 DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention a trait au domaine des hydrogels à base de xanthane et chitosane. Plus précisément, l'invention a trait aux domaines de l'alimentation et de la dermatologie où de tels hydrogels sont chargés de principes actifs tels vitamines, acides nucléiques, acides aminés, oligopeptides.

10

ARRIÈRE PLAN TECHNOLOGIQUE

Il est connu de fabriquer des hydrogels à partir de chitosane et de xanthane. Les brevets américains 5,620,706 et 5,648,252 présentent de tels hydrogels utilisés comme support inerte pour l'immobilisation d'enzymes ou pour la libération contrôlée de certains antibiotiques ou agents anti-cancer. Cependant, l'application d'hydrogels de chitosane et de xanthane pour chargement, stabilisation et relargage de vitamines, acides nucléiques, acides aminés et oligopeptides est jusqu'à présent inexplorée.

Une des problématiques courantes dans la fabrication de compléments alimentaires ainsi qu'en dermatologie est la conservation d'ingrédients actifs très sensibles à la dégradation tels que vitamines, acides nucléiques, acides aminés, et oligopeptides. L'exposition à la lumière et la chaleur accélère cette dégradation.

Compte tenu de l'important potentiel bénéfique de ces ingrédients actifs, plusieurs véhicules tels comprimés, capsules, gellules, crèmes, onguents, gels, dispersions aqueuses (émulsions) et solutions, furent développées dans le but

d'offrir une protection des produits actifs contre la dégradation ou pour les rendre hydrophobes. Cependant, plusieurs désavantages de ces préparations synthétiques, tels le potentiel irritant et la toxicité furent soulignés.

5 Faute de trouver un véhicule adéquat parmi les excipients conventionnels, l'utilisation de polycations synthétiques fut récemment proposée. Par exemple, la demande de brevet européen 504 066 A1, 1992, déposée par L'Oréal, France, propose des compositions cosmétiques contenant une dispersion de particules solides actives dont la surface est revêtue d'un polymère cationique. Cependant, le but du revêtement cationique est de
10 rendre la composition stable dans son ensemble par opposition à stabiliser un ingrédient faisant face à une tendance à la dégradation.

Un important besoin demeure donc pour la découverte d'un nouveau véhicule utile en préparations alimentaires, cosmétologie et dermatologie pour contenir des ingrédients actifs photosensibles et thermosensibles tels vitamines, acides
15 nucléiques, acides aminés et oligopeptides. Un des buts de la présente invention est donc d'enseigner des préparations alimentaires et dermatologiques contenant un hydrogel polyionique naturel permettant la protection d'ingrédients actifs photo et thermo sensibles sans toutefois démontrer un potentiel irritant ou toxique. Un autre but connexe est
20 l'enseignement d'une méthode permettant l'introduction de ces ingrédients actifs dans un hydrogel polyionique naturel.

D'autres buts et objets de la présente invention deviendront apparents à la lecture de la description détaillée qui suit. Il importe de noter que cette description détaillée présente des incorporations et exemples préférentiels de
25 l'invention et est fournie à titre d'illustration. Ceux spécialisés dans le domaine de l'invention pourront apporter plusieurs aménagements et modifications à ces incorporations et exemples préférentiels sans toutefois dépasser le cadre de la présente invention.

SOMMAIRE DE L'INVENTION

De façon générale, l'invention porte sur une composition thermo et photo stable comprenant un hydrogel formé d'un complexe de xanthane et chitosane, l'hydrogel comprenant au moins une substance thermo ou photo sensible choisie parmi les substances suivantes : vitamines, acides aminés, acides nucléiques et oligopeptides, l'hydrogel étant adapté à relarguer ces dites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain. Préféralement, les substances thermo ou photo sensibles seront présentes dans une proportion de 5 à 25 % du poids total de la composition. Plus
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

Préféralement, ces substances seront choisies parmi les vitamines A, B, C, D, E, et K.

L'invention porte aussi sur une méthode de fabrication de la composition inventive, la méthode comprenant les étapes suivantes :

- (a) la dissolution des substances liposolubles dans un solvant approprié;
- 15 (b) l'ajout de cette solution, sous agitation, à une solution de xanthane;
- (c) la pulvérisation du mélange de l'étape (b) à une solution de chitosane;
- (d) la récupération de l'hydrogel ainsi formé;
- (e) l'incorporation des substances liposolubles de l'étape (a) par diffusion dans l'hydrogel;
- 20 toutes les étapes se faisant en l'absence d'oxygène et de lumière.

Dans une autre méthode selon l'invention, la composition de l'invention pourra être obtenue par les étapes suivantes :

- (a) la pulvérisation d'une solution de xanthane dans une solution de chitosane;

4

- (b) la récupération de l'hydrogel ainsi formé sera caractérisée par une lyophilisation de l'hydrogel;
- (c) l'introduction du l'hydrogel lyophilisé dans une solution aqueuse comprenant les substances hydrosolubles pouvant être avantageusement stabilisées par l'ajout d'acides aminiques tels les L-cystéine, L-cystine et L-méthionine ou mélange de ces derniers ou par l'ajout de tripeptides;
- (d) incorporation des substances hydrosolubles dans l'hydrogel par diffusion des substances hydrosolubles lors du gonflement de l'hydrogel, ledit hydrogel ayant un degré de gonflage de 2000 % ou plus.
- 10 Sous un aspect additionnel, l'invention présente une méthode d'utilisation de ces hydrogels en dermatologie ou comme complément alimentaire.

BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

- Figure 1 Complexation entre le chitosane et xanthane
- 15 Figure 2 Schéma du montage pour l'étude cinétique
- Figure 3 Masse de Vitamine C libérée en fonction du temps
Échantillon codé VS2L. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 1800 %
- 20 Figure 4 Vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps.
Échantillon codé VS2L
- Figure 5 Masse de vitamine C en fonction du temps
Échantillon codé VS2R. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 2200 %
- 25 Figure 6 Vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps
Échantillon codé VS2R

Figure 7 Variation du pourcentage de la Vitamine C libérée en fonction du temps

Échantillon VS2M Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 3500 %

5

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

La présente description détaillée révèle des compositions alimentaires et dermatologiques comprenant un ou plusieurs ingrédients actifs photo ou thermo sensibles à la dégradation. Ces compositions comprenant un hydrogel polyioniques formé d'un complexe de chitosane et xanthane pouvant contenir et protéger les ingrédients actifs photo et thermo sensibles ainsi que bonifier leur activité par un effet de libération contrôlée.

Il est aussi décrit deux méthodes d'incorporation des ingrédients actifs dans l'hydrogel de chitosane et xanthane. Les Ingrédients actifs liposolubles sont introduits dans l'hydrogel par une première méthode lors de la fabrication de l'hydrogel. Les ingrédients actifs hydrosolubles sont introduits par une méthode de diffusion dans l'hydrogel faisant suite à la fabrication de l'hydrogel.

La présente invention démontre, de façon surprenante et innovatrice la possibilité d'introduire diverses vitamines ou autres ingrédients tels acides aminés, acides nucléiques et oligopeptides dans un hydrogel pour ensuite relarguer ses substances par différentes voies, tels doses orales, suppositoires, crèmes, onguents, gels, solutions, dispositifs transcutanés ("patch"). Par surcroît, la présente invention révèle la possibilité d'introduire et de solubiliser dans un même hydrogel des vitamines liposolubles ou hydrosolubles.

Finalement, il est aussi décrit une méthode de fabrication d'un complément alimentaire et d'une crème dermatologique incorporant l'hydrogel de la présente invention.

Il est à noter que les termes "dermatologie" et "dermatologique" sont employés dans leur sens large incluant ainsi toutes applications cosmétologique et cosmétique. De plus, ces termes s'étendent à des applications sur la peau ou sur les phanères.

- 5 Le terme "complément alimentaire" s'entend aussi dans son sens large incluant ainsi toute préparation alimentaire, le complément étant utilisé dans un rôle nutritionnel ou thérapeutique ou encore dans un simple rôle physique dans la préparation alimentaire, par exemple, en tant qu'agent texturant, de remplissage ou de contrôle de viscosité.
- 10 Les compositions de la présente invention sont destinés principalement au humains mais peuvent aussi avoir application dans le domaine vétérinaire.

Se référant à la figure 1, il est constaté que l'hydrogel utilisé dans la présente invention est un complexe à base de chitosane et xanthane issu d'une réaction ionique entre ces deux polyions. Une méthode de fabrication de l'hydrogel

15 est décrite dans le brevet américain 5,720,206 accordé au même cessionnaire que la présente demande. Tel qu'illustré dans la figure 1, le xanthane et le chitosane forme un complexe c'est-à-dire l'établissement de divers liens ioniques entre les molécules de chitosane et de xanthane formant ainsi l'hydrogel.

20

Inclusion de vitamines liposolubles dans l'hydrogel chitosane-xanthane

vitamine A

La vitamine A (Retinol) est un produit très sensible à la lumière et à l'oxygène. L'utilisation de ce produit dans une crème à titre d'exemple, ne peut se faire

25 que si le produit est préalablement stabilisé contre les effets négatifs des agents précités. La méthode de la présente invention consiste à stabiliser la vitamine

A dans un hydrogel composé de xanthane et de chitosane préparé selon la méthode décrite dans le brevet américain 5,620,706.

Exemple 1 inclusion de la vitamine A durant la fabrication

Une solution (100 ml) de vitamine A (10 - 20 % w/v) dans l'alcool éthylique a
5 d'abord été préparée. Cette solution est ajoutée, sous forte agitation, à 500 ml
d'une solution de xanthane, 0,65 % w/v, pour obtenir une concentration finale
en vitamine A de 1,66 - 3,33% w/v. La solution peut être conservée à 3 °C.
Par la suite, un système de pulvérisation est utilisé pour ajouter la solution de
vitamine A - xanthane à 800 ml d'une solution de chitosane 0,65 % w/v. La
10 réaction doit se poursuivre pendant 30 min. Le gel formé doit être filtré et lavé
avec de l'eau pour atteindre un pH de 6.8. Pour augmenter la stabilité finale
du gel, un dernier lavage avec une solution de bicarbonate de sodium 1 % w/v
amène le gel à un pH de 7.5. Le gel est par la suite congelé et lyophilisé.
Toutes les opérations, incluant la congélation, se font en l'absence d'oxygène
15 et de lumière.

Exemple 2 Inclusion de la vitamine A par diffusion

En utilisant un hydrogel à base de xanthane-chitosane possédant un degré de gonflage () d'au minimum 2000% il est possible d'introduire la vitamine A par diffusion. Le degré de gonflage se définit selon la formule suivante:

$$20 \quad - 100\% \times \frac{\text{masse d'hydrogel gonflé à l'équilibre} - \text{masse d'hydrogel sec}}{\text{masse d'hydrogel sec}}$$

Dans ces conditions, on diminue de façon importante le temps de manipulation prévenant ainsi la dégradation de la molécule. Pour ce faire, il suffit de dissoudre 0,07 g de Vitamine A dans 1 ml d'alcool éthylique (96%) et
25 d'y ajouter 1,5 g du complexe xanthan-chitosane lyophilisé avec = 2500 %.
Une légère agitation permet d'obtenir une pâte homogène. On ajoute alors 2

14-07-2000

8

ml d'alcool éthylique et 200 l d'eau toujours sous légère agitation et on place le tout a 4°C pendant 24 h a l'abri de la lumière. L'alcool est par la suite évaporé à 4°C. Le produit fini possède une concentration de 46 mg de Vitamine A / g produit lyophilisé.

5 Exemple 3 Inclusion de la vitamine E

Pour l'incorporation de la Vitamine E, la méthode (1) développée pour la vitamine A est appliquée. La concentration en vitamine E peut atteindre jusqu'à 20 %.

Exemple 4 Inclusion de la vitamine K

- 10 En ce qui concerne la vitamine K, la même méthode (1) que pour la vitamine A avec une concentration de vitamine K pouvant atteindre 20 %.

Inclusions de vitamines solubles dans l'eau

- 15 Pour les produits bioactifs solubles dans l'eau il est préférable d'utiliser la méthode de diffusion dans l'hydrogel lyophilisé pour éviter les pertes inévitables de produits pendant la réaction entre le xanthane et le chitosane. Il est nécessaire dans cette condition d'avoir une hydrogel avec une degré de gonflage d'au minimum 2000 %.

Exemple 5 Inclusion de la vitamine C

- 20 Parce que la vitamine C présente une forte action oxydo-réductrice en regard du chitosane, une nouvelle méthode d'inclusion a été développée. Cette méthode comprend deux (2) étapes :

Étape 1 La préparation du complexe xanthane-chitosane (CHITOXAN^{MC}), c'est-à-dire l'hydrogel polyionique;

Étape 2 L'incorporation de la Vitamine C.

1- Préparation du complexe xanthane-chitosane

Le complexe CHITOXAN^{MC} se prépare par la méthode décrite antérieurement, soit celle du brevet américain 5,620,706 . Le chitosane utilisé pour préparer ce complexe a typiquement un poids moléculaire compris entre 250,000 et 350,000, et l'hydrogel un 2000%.

Le CHITOXAN^{MC} est moulu pour obtenir une fine poudre avec des particules ayant un diamètre compris entre 250 et 500 m.

2- Incorporation de la vitamine C

2a. Stabilisation par acides aminiques

- À 10 ml d'eau, on ajoute 1 g de vitamine C, 0,06 g de L-cystéine, 0,02 g de L-cystine, 0,02 g de L-méthionine. Par la suite, on ajoute 1 g du CHITOXAN^{MC} lyophilisé avec des particules de 250 - 500 m. Le mélange ne doit pas présenter de phase liquide en excès. Si nécessaire, de l'eau peut être ajoutée. On maintient le mélange pendant 2 hrs pour arriver à l'équilibre d'hydratation.
- Toutes les opérations doivent se faire en l'absence de lumière. Le mélange est par la suite congelé et lyophilisé. La transformation en poudre du produit final donne des particules variant entre 50 et 125 m.

- La vitamine C ainsi incorporée et hydratée présente une stabilité, sans aucun changement de coloration, de 2 semaines à 45 °C et de 20 semaines pour le gel sec à cette même température. Il est possible d'utiliser comme agent de stabilisation, de l'acide tartrique 0,1 %, de l'acide métaphosphorique 0,03 % ou de l'acide citrique 0,1 %. Le pourcentage pondéral est par rapport au complexe CHITOXAN^{MC}.

2b. Stabilisation par tripeptides

- On utilise la méthode 2a, en remplaçant les acides-aminés par le tripeptide avec acides aminiques sulfurés. À 10 ml d'eau, on ajoute 1 g de vitamine C et

- 0,002 g de glutathione. Après 5 minutes d'agitation on introduit 1 g CHITOXAN^{MC} et on agite légèrement jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. On laisse en repos pendant 2 hrs pour arriver à l'équilibre d'hydratation. La pâte est congelée et lyophilisée. Toutes les opérations
- 5 doivent se faire en l'absence de lumière.

Extraction et dosage de la vitamine C incluse dans le CHITOXAN^{MC}

Extraction

Solvant d'extraction : solution aqueuse d'acide méraphosphorique 3 % (w/v),
8 % acide acétique (v/v)

- 10 Méthode : Dans un tube à centrifuger de 50 ml protégé contre la lumière, on introduit de 20 jusqu'à 30 mg de CHITOXAN^{MC} + Vit. C lyophilisé et 40 ml du solvant d'extraction. Agiter pendant 60 min avec un barreau magnétique. Finalement, la suspension est centrifugée (4000 rpm) et le surnageant est analysé.

15 Détermination quantitative de la vitamine C

- Avant de procéder à la détermination quantitative de la vitamine C, il faut mesurer le maximum d'absorption dans un spectrophotomètre UV-VIS. Le standard se prépare en utilisant une solution de vitamine C, qui a servi à la fabrication du CHITOXAN^{MC}-Vit. C, dans le solvant d'extraction. Notre test a
- 20 donné un maximum d'absorption à 243 nm pour la vitamine C type ALDRICH, pureté 98 %

- Après avoir évalué le maximum d'absorption, on détermine la courbe étalon (absorption en fonction de la concentration de la vitamine C). Dans une fiole jaugée, on prépare une solution de vitamine C dans le solvant d'extraction à
- 25 une concentration de 1,3 mg / ml. La solution est préparée juste avant de

14-07-2000

11

procéder à l'analyse. Par dilution successive, on mesure la dépendance absorption / concentration (mg / ml).

La concentration du surnageant obtenu dans l'extraction est déterminée par photolorimétrie à 243 nm et calculée à partir de la courbe étalon.

- 5 La concentration de la vitamine C dans l'échantillon préparé par la méthode 2a est de 49.6%.

Inclusion du CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une base de crème

- 10 1 g de Chitoxan^{MC}-Vit. C est hydraté avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'une pâte crémeuse. Par la suite, il suffit de peser la pâte et de calculer la concentration donnée en vitamine C. Subséquemment, la pâte est introduite sous forte agitation dans la base de crème pour obtenir une concentration finale désirée en vitamine, préférablement de 5 à 25% poids.

- 15 **Détermination de la stabilité de la vitamine C incluse dans une base de crème**

- 20 10 g de la préparation obtenue par inclusion de CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une base crème est introduite dans un tube protégé de la lumière. Ce tube est par la suite chauffé à 45°C. Pour déterminer le taux de dégradation de la vitamine C dans la base de crème, on prend un échantillon qui correspond à environ 10 - 30 mg de vitamine C. Cet échantillon est pris à chaque jour et ce pendant les 4 premiers jours et par la suite à tous les 2 jours pour un total de 30 jours. Si les échantillons ne sont pas analysés tout de suite, ils doivent être conservés au congélateur (-4°C).

- 25 Les échantillons prélevés sont analysés de la manière décrite précédemment (toujours en utilisant le solvant d'extraction).

À partir des échantillons VS2L, VS2R et VS2M on a préparé des crèmes avec une concentration de 5% à 25% poids en vitamine C. En utilisant la méthode décrite, on a trouvé une bonne stabilité de la vitamine C incluse dans le CHITOXAN: aucune coloration de la crème après un chauffage à 45 °C pendant 30 jours alors que la décomposition de la vitamine C a été de 15%. Pour une crème préparée à partir de vitamine C libre, on a trouvé, dans les mêmes conditions, une décomposition de 98% et une coloration orangée.

Cinétique de libération

Se référant au Tableau 1 ci-bas, trois types d'hydrogels CHITOXAN^{MC}-Vit. C furent étudiés. Tel qu'illustré parla figure 2, la cinétique de relargage de la vitamine C est déterminée en introduisant une quantité précise du CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans le réacteur. Les courbes cinétiques de libération ont été réalisées à température ambiante en présence de lumière par l'utilisation d'un stabilisant de la vitamine C constitué de 3%/vol d'acide métaphosphorique et de 8%/vol d'acide acétique.

Tableau 1

Code des préparations CHITOXAN ^{MC} -Vit. C	Degré de gonflage () du CHITOXAN ^{MC} (%)	Concentration de vitamine C dans le CHITOXAN ^{MC} -Vit. C (%)
VS2L	1800	50,3
VS2R	2200	49,6
VS2M	3500	51,0

Le solvant (mélange 3 % w/v acide métaphosphorique et 8 % w/v acide acétique) pénètre par le tuyau central directement dans le réacteur où il entre en contact avec le CHITOXAN^{MC}-Vitamine C. La vitamine C se libère graduellement du complexe et entre en solution dans le solvant. Le solvant s'échappe du réacteur par les petits orifices et se retrouve dans le tube extérieur. Avec cette méthode, on assure une circulation constante de solvant autour de l'échantillon à analyser.

Se référant maintenant à la figure 3, il est vu que la masse de vitamine C libérée montre une relation linéaire en fonction du temps (cinétique d'ordre zéro) avec une cassure nette après 60 minutes dans le cas du CHITOXAN^{MC}-Vit. C de type VS2L et 40 minutes dans le cas du CHITOXAN^{MC}-Vitamine C type VS2R.

Se référant maintenant à la figure 4, il est vu dans un premier cas (CHITOXAN^{MC}-Vit. C de type VS2L) que la vitamine C diffuse à une vitesse constante de 0.36 mg/min pendant la première période, puis la vitesse diminue de moitié pour les 100 minutes suivantes.

Dans le deuxième cas illustré aux figures 5 et 6 la diffusion s'effectue beaucoup plus rapidement dans les 40 premières minutes avec une vitesse de 1.18 mg/min, puis elle est presque nulle avec une valeur de 0,02 mg/min. La figure 5 montre la masse de vitamine C en fonction du temps pour l'échantillon codé VS2R. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 2200 %. La figure 6 montre la vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps pour l'échantillon codé VS2R.

La figure 7 montre la variation du pourcentage de la Vitamine C libérée en fonction du temps pour un échantillon VS2M Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 3500 %. Pour

cet échantillon, une libération de 85 % de la vitamine C dans les premiers 10 minutes d'élution fut constatée.

Inclusion du CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une préparation alimentaire

- 5 L'Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C et d'autres hydrogels chitosane-xanthane contenant vitamines, acides nucléiques, acides aminés et oligopeptides peuvent aussi être utilisés dans des préparations alimentaires hydratées telles que gelées, sauces et sirops ainsi que dans des préparations déshydratées.

10 Les caractéristiques physiques de l'hydrogel chitosane-xanthane choisi détermineront la structure et la texture plus ou moins visqueuse de l'hydrogel. Ce choix d'hydrogel selon la présente invention permettra donc d'adapter l'hydrogel à diverses applications alimentaires.

- 15 Par surcroît, la présente invention comporte la mise en pastille de la poudre CHITOXAN-Vit. C avec d'autres ingrédients actifs, si requis. Il est aussi prévu la mise en pastille d'une poudre lyophilisée d'autres hydrogels chitosane-xanthane contenant vitamines diverses, acides aminés, acides nucléiques, oligopeptides ou une combinaison parmi ces ingrédients actifs.

Il va de soi que la présente demande peut recevoir aménagements et variantes sans pour autant sortir du cadre de la présente invention telle que décrite.

REVENDEICATIONS :

1. Composition thermo et photo stable comprenant un hydrogel formé d'un complexe de xanthane et chitosane, ledit hydrogel comprenant au moins une substance thermo ou photo sensible choisie parmi les substances
5 suivantes: vitamines, acides aminés, acides nucléiques et tripeptides, ledit hydrogel étant adapté à relarguer sur plusieurs heures ces dites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain.
2. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances thermo ou photo sensible sont des vitamines dans une proportion de 5 à 25%
10 du poids total de la composition.
3. Composition selon la revendication 2 dans laquelle les vitamines sont choisies parmi les vitamines A, B, C, D, E et K.
4. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la vitamine est la vitamine A.
- 15 5. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la vitamine est la vitamine C.
6. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances thermo et photo sensibles sont aussi liposolubles.
7. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances
20 thermo et photo sensibles sont aussi hydrosolubles.
8. Méthode de fabrication de la composition de la revendication 6 comprenant les étapes suivantes:
 - (a) la dissolution des substances liposolubles dans l'alcool éthylique;

- (b) l'ajout de cette solution, sous agitation, à une solution de xanthane;
- (c) la pulvérisation du mélange de l'étape (b) à une solution aqueuse de chitosane;
- 5 (d) la récupération de l'hydrogel ainsi formé;
- (e) l'incorporation des substances liposolubles dans l'hydrogel par diffusion des substances liposolubles dissoutes dans l'éthanol (95%/vol) et ce à une concentration de 50%/vol.

toutes les étapes se faisant en l'absence d'oxygène et de lumière.

10 9. Méthode de fabrication de la composition de la revendication 7 comprenant les étapes suivantes:

- (a) la pulvérisation d'une solution de xanthane dans une solution de chitosane;
- 15 (b) la récupération de l'hydrogel ainsi formé, cette récupération étant caractérisée par une lyophilisation de l'hydrogel;
- (c) l'introduction du l'hydrogel lyophilisé dans une solution aqueuse comprenant les substances hydrosolubles;
- 20 (d) incorporation des substances hydrosolubles dans l'hydrogel par diffusion des substances hydrosolubles lors du gonflement de l'hydrogel, ledit hydrogel ayant un degré de gonflage de 2000 % ou plus.

10. La méthode de fabrication de la revendication 9 dans laquelle, lors de l'étape (c), la stabilisation des substances hydrosolubles est favorisée par l'ajout d'acides aminiques.

11. La méthode de la revendication 10 dans laquelle les acides aminiques sont choisis parmi les L-cystéine, L-cystine et L-méthionine ou mélange de ces derniers.
12. La méthode de fabrication de la revendication 9 dans laquelle, lors de l'étape (c), la stabilisation des substances hydrosolubles est favorisée par l'ajout de tripeptides.
13. L'utilisation de la composition de l'une ou l'autre des revendications 1 à 7 dans la fabrication d'un produit dermatologique.
14. L'utilisation de la revendication 13 dans laquelle le produit dermatologique est une crème.
15. L'utilisation de la revendication 14 dans laquelle la substance thermo et photo sensible est la vitamine A.
16. L'utilisation de la composition de l'une ou l'autre des revendications 1 à 7 dans la fabrication d'un complément alimentaire.

PCT

REQUETE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) AML/12616.12

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION HYDROGELS POLYIONIQUES À BASE DE XANTHANE ET CHITOSANE POUR STABILISATION ET RELARGAGE CONTRÔLE DES VITAMINES

Cadre n° II DEPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

KEMESTRIE INC.
4245, rue Garlock
Sherbrooke, Québec
J1L 2C8
CANADA

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone
(819) 569-4888

n° de télécopieur
(819) 569-8411

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) :
CA

Domicile (nom de l'Etat) :
CA

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☒ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

CHORNET, Esteban
470, rue Montmagny
Sherbrooke, Québec
J1L 1H3
CANADA

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :
CA

Domicile (nom de l'Etat) :
CA

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/à été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme: ☒ mandataire ☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

DUBUC, Jean H.; LECLERC, A.; PRINCE, G.; LUPIEN M
Goudreau Gage Dubuc & Martineau Walker
Tour de la Bourse
800 Place Victoria, bureau 3400
P.O.Box 242
Montréal, Québec, H4Z 1E9, CANADA

n° de téléphone
(514) 397-7604

n° de télécopieur
(514) 397-4382

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
<i>Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.</i>	
<p>Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</p> <p>DUMITRIU, Severian 750 McGregor Sherbrooke, Québec J1L 1V7 CANADA</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</p>
Nationalité (nom de l'Etat) : CA	Domicile (nom de l'Etat) : CA
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</p>
Nationalité (nom de l'Etat) :	Domicile (nom de l'Etat) :
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</p>
Nationalité (nom de l'Etat) :	Domicile (nom de l'Etat) :
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</p>
Nationalité (nom de l'Etat) :	Domicile (nom de l'Etat) :
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p><input type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.</p>	

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être) :

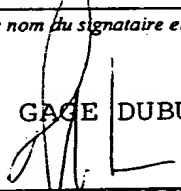
Brevet régional

- ☒ **AP** Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ **EA** Brevet eurasién : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasién et du PCT
- ☒ **EP** Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ **OA** Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :

- | | |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanie | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Arménie | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Autriche | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input checked="" type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbade | <input checked="" type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarie | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Bélarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN Chine | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Allemagne | <input checked="" type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Danemark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonie | <input checked="" type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Espagne | <input checked="" type="checkbox"/> SE Suède |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finlande | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenade | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Géorgie | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambie | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatie | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hongrie | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonésie | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israël | <input checked="" type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Inde | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Islande | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR République de Corée | Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille : |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Déclaration concernant les désignations de précaution : outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITE				
<input type="checkbox"/> D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.				
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 17 juillet 98 (17/07/1998)	2,243,619	CA		
(2)				
(3)				
<input checked="" type="checkbox"/> L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : <u>(1)</u>				
<i>* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii). Voir le cadre supplémentaire.</i>				
Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE				
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA /		Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional)		
Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DEPOT				
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant : requête : 4 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 12 revendications : 4 abrégé : 1 dessins : 7 partie de la description réservée au listage des séquences : Nombre total de feuilles : 28		Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input checked="" type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffable par ordinateur 9. <input type="checkbox"/> autres éléments (préciser) :		
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé : 1		Langue de dépôt de la demande internationale : FRANCAIS		
Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE				
<i>A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.</i>				
 GOUDREAU GACE DUBUC & MARTINEAU WALKER ALAIN M. LECLERC				
Réservé à l'office récepteur				
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :		2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :		
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :				
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :				
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /		6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.		
Cadre n° X				
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :				

PCT

FEUILLE DE CALCUL DES TAXES

Annexe de la requête

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Référence du dossier du
déposant ou du mandataire

AML/12612.12

Timbre à date de l'office récepteur

Déposant

KEMESTRIE INC. et al

CALCUL DES TAXES PRESCRITES

1. TAXE DE TRANSMISSION 200.00 T

2. TAXE DE RECHERCHE 1 874.00 S

Recherche internationale à effectuer par

(Si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont
compétentes en ce qui concerne la demande internationale, inscrire le nom de celle
qui est choisie pour la recherche internationale.)

3. TAXE INTERNATIONALE

Taxe de base

La demande internationale contient 28 feuilles.

30 premières feuilles 641.00 b1

0 x 15 = b2

feuilles suivantes montant additionnel

Additionner les montants portés dans les cadres

b1 et b2 et inscrire le total dans le cadre B 641.00 B

Taxes de désignation

La demande internationale contient 79 désignations.

10 x 148.00 = 1 480.00 D

nombre de taxes de montant de la taxe de désignation

désignation dues (maximum 11)

Additionner les montants portés dans les cadres B et D, et

inscrire le total dans le cadre I

(Les déposants de certains Etats ont droit à une réduction de 75 % sur la taxe
internationale. Lorsque le déposant a (ou tous les déposants ont) droit à cette
réduction, la somme devant figurer sous I est égale à 25 % de la somme des
montants figurant sous B et D.)

2 121.00 I

4. TAXE AFFERENTE AU DOCUMENT DE PRIORITE (le cas échéant) P

5. TOTAL DES TAXES DUES

Additionner les montants portés dans les cadres

T, S, I et P, et inscrire le résultat dans le cadre TOTAL 4 195.00

TOTAL

☐ Les taxes de désignation seront payées ultérieurement.

MODE DE PAIEMENT

☐ autorisation de débiter un compte
de dépôt (voir ci-dessous)

☐ traite bancaire

☐ coupons

☐ chèque

☐ espèces

☒ autres (préciser):

☐ mandat postal

☐ timbres fiscaux

VISA

AUTORISATION CONCERNANT UN COMPTE DE DEPOT (les offices récepteurs ne permettent pas tous l'utilisation de ce mode de paiement)

L'office récepteur/ CA ☐ est autorisé à débiter mon compte de dépôt du total des taxes indiqué ci-dessus.

☒ est autorisé à débiter mon compte de dépôt de tout montant manquant – ou à le créditer de tout
excédent – dans le paiement du total des taxes indiqué ci-dessus.

☒ est autorisé à débiter mon compte de dépôt du montant de la taxe afférente à l'établissement du
document de priorité et à sa transmission au Bureau international de l'OMPI.

600000102

16 juillet 1999

Numéro du compte de dépôt

Date (jour/mois/année)

Signature

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To:
GOUDREAU GAGE DUBUC & MARTINEAU
WALKER
Attn. DUBUC, J
Stock Exchange Tower
800 Place Victoria, Suite 3400
Montreal, Quebec H4Z 1E9
CANADA

Date of mailing
(day/month/year)

05/11/1999

Applicant's or agent's file reference

AML/12616.12

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/CA 99/00651

International filing date
(day/month/year)

16/07/1999

Applicant

KEMESTRIE INC. et al.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Further action(s):** The applicant is reminded of the following:

Shortly after **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within **19 months** from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within **20 months** from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alfredo Prein

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AML/12616.12	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/CA 99/ 00651	International filing date (day/month/year) 16/07/1999	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 17/07/1998
Applicant KEMESTRIE INC. et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 3 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the **title**,

the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.

1
☐

None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/CA 99/00651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08L5/08 C08L5/00 A23L1/302 A23L1/303 A61K9/06
A61K31/07 A61K47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08L C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 3 833 744 A (R. A. BOMSTEIN) 3 September 1974 (1974-09-03) column 1, line 19 - line 25 column 1, line 35 - line 37 column 1, line 55 - line 59 column 2, line 67 - line 69 column 6; claims 1,5; example XII ---	1, 16
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 21, 23 May 1994 (1994-05-23) Columbus, Ohio, US; abstract no. 268799, "Preparation of soybean protein gel" XP002116026 abstract & JP 06 022701 A (FUJI OIL CO LTD) 1 February 1994 (1994-02-01) --- -/--	1-3, 5, 16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 1999

Date of mailing of the international search report

05/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/CA 99/00651

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 5 620 706 A (DUMITRIU ET AL.) 15 April 1997 (1997-04-15) cited in the application abstract</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 99/00651

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 3833744	A	03-09-1974	NONE		
JP 06022701	A	01-02-1994	JP	2841954 B	24-12-1998
US 5620706	A	15-04-1997	CA	2148851 A	11-10-1996

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 mars 2000 (21.03.00)	Référence du dossier du déposant ou du mandataire AML/12616.12
Demande internationale no PCT/CA99/00651	Date de priorité (jour/mois/année) 17 juillet 1998 (17.07.98)
Date du dépôt international (jour/mois/année) 16 juillet 1999 (16.07.99)	
Déposant CHORNET, Esteban etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

16 février 2000 (16.02.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Olivia RANAIVOJAONA

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AML/12616.12	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/CA 99/ 00651	International filing date (day/month/year) 16/07/1999	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 17/07/1998
Applicant KEMESTRIE INC. et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 3 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the **title**,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.

1



None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CA 99/00651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08L5/08 C08L5/00 A23L1/302 A23L1/303 A61K9/06
 A61K31/07 A61K47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08L C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 3 833 744 A (R. A. BOMSTEIN) 3 September 1974 (1974-09-03) column 1, line 19 - line 25 column 1, line 35 - line 37 column 1, line 55 - line 59 column 2, line 67 - line 69 column 6; claims 1,5; example XII ---	1,16
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 21, 23 May 1994 (1994-05-23) Columbus, Ohio, US; abstract no. 268799, "Preparation of soybean protein gel" XP002116026 abstract & JP 06 022701 A (FUJI OIL CO LTD) 1 February 1994 (1994-02-01) --- -/--	1-3,5,16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 1999

Date of mailing of the international search report

05/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CA 99/00651

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 620 706 A (DUMITRIU ET AL.) 15 April 1997 (1997-04-15) cited in the application abstract -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 99/00651

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3833744 A	03-09-1974	NONE	
JP 06022701 A	01-02-1994	JP 2841954 B	24-12-1998
US 5620706 A	15-04-1997	CA 2148851 A	11-10-1996

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 27 OCT 2000

WIPO PCT



Référence du dossier du déposant ou du mandataire AML/12616.12	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/CA99/00651	Date du dépôt international (jour/mois/année) 16/07/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 17/07/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C08L5/08		
Déposant KEMESTRIE INC. et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 17 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/02/2000	Date d'achèvement du présent rapport 25.10.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Gerber, M N° de téléphone +49 89 2399 8528 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/CA99/00651

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-14	reçue(s) le	20/07/2000	avec la lettre du	14/07/2000
------	-------------	------------	-------------------	------------

Revendications, N°:

9-16	reçue(s) le	20/07/2000	avec la lettre du	14/07/2000
------	-------------	------------	-------------------	------------

1-8	reçue(s) le	29/09/2000	avec la lettre du	28/09/2000
-----	-------------	------------	-------------------	------------

Dessins, feuilles:

1/7-7/7	version initiale
---------	------------------

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/CA99/00651

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence au document suivant :

D1: US-A-5 620 706 (DUMITRIU ET AL.) 15 Avril 1997, cité dans la demande

1. Nouveauté

L'objet des revendications 1-16 est considéré comme nouveau par rapport à l'art antérieur disponible (Article 33(2) PCT).

En effet, D1 décrit une méthode de préparation d'un hydrogel par complexation de xanthane et de chitosane, utilisé pour immobiliser des composés biologiquement actifs, comme par exemple des **protéines et des enzymes**, qui sont ensuite relargués par diffusion. L'**activité biologique** de ces substances est ainsi préservée, voire augmentée (colonne 1, lignes 57-62). Par ailleurs, alors que l'activité enzymatique de la xylanase et de la protéase augmentent suite à l'immobilisation dans le gel de xanthane / chitosane, leur **stabilité thermique** augmente dans le premier cas et diminue dans le second (colonne 13, lignes 3-8).

La méthode de préparation de l'hydrogel consiste en l'ajout d'enzymes à une solution aqueuse de xanthane dans des concentrations allant de 0,5 à 1,8% en poids. La solution ainsi obtenue est alors agitée à 15°C pendant 15 minutes, et introduite au goutte à goutte, à l'aide d'une seringue, dans une solution de chitosane. Le pH de la solution est ensuite ajusté en fonction du type d'enzyme utilisé. Les microsphères ainsi obtenues sont agitées pendant 15 minutes à température ambiante (20-29°C) et lavées avec une solution tampon d'acétate (colonne 6, lignes 24-37).

L'hydrogel ainsi préparé peut être utilisé pour l'application de substances sur la peau, notamment au moyen de patches, car ce dernier est stable dans les domaines de pH physiologiques (colonne 12, lignes 57-62).

La différence entre la présente demande et D1 réside dans l'utilisation de vitamines,

acides aminés, acides nucléiques et tripeptides à la place des protéines et enzymes pour immobilisation dans l'hydrogel de xanthane et de chitosane.

2. Activité inventive

a. Une activité inventive peut être reconnue pour l'objet des revendications 1-7 (Article 33(3) PCT).

D1 est considéré comme l'art antérieur le plus proche.

Les compositions des revendications 1-7 diffèrent principalement de celles décrites dans D1 par le type de composé ajouté à l'hydrogel formé d'un complexe de chitosane et de xanthane.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme étant de trouver d'autres composés biologiquement actifs susceptibles d'être immobilisés par ledit hydrogel, celui-ci leur conférant une protection contre la chaleur et la lumière.

La solution de ce problème, proposée dans les revendications 1-7 est inventive.

L'hydrogel de D1 permet certes de préserver ou d'augmenter l'activité biologique des enzymes et protéines immobilisés (colonne 1, lignes 58-62). Il ne confère cependant pas la stabilité à la chaleur revendiquée dans la présente demande pour tous les types d'enzymes. Par exemple, en ce qui concerne la xylanase, à la fois la stabilité à la chaleur et l'activité enzymatique sont augmentées par immobilisation dans l'hydrogel de xanthane/chitosane. Quant à la protéase, l'activité enzymatique est maintenue par immobilisation dans l'hydrogel mais la stabilité thermique diminue (colonne 13, lignes 4-5).

D1 ne permet donc pas d'établir une tendance générale concernant l'effet de l'hydrogel sur la stabilité thermique des enzymes qui s'y trouvent immobilisés.

En outre, D1 mentionne l'utilisation du dit hydrogel comme support pour d'autres substances (médicaments, cellules eucaryote et procaryote, substances

pharmaceutiques polybasiques, colonne 7, lignes 2-38), permettant le relargage contrôlé de ces dernières, mais ne suggère aucunement une quelconque protection contre la chaleur et la lumière.

La personne du métier, constatant que des composés proches de par leur structure et leur activité présentent des comportements opposés à la chaleur lorsqu'ils sont inclus dans l'hydrogel de xanthane/chitosane, ne peut donc prévoir si des composés structurellement différents inclus dans ce même gel présenteront ou non une stabilité à la chaleur.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-7 ne relève pas d'une démarche technique évidente pour l'homme du métier et implique par conséquent une activité inventive (Article 33(3) PCT).

b. Les méthodes de synthèse des compositions thermo- et photostables des revendications 8-12 ainsi que les utilisations de compositions telles que revendiquées dans les revendications 14-16 sont donc également inventives.

3. Application industrielle

Le contenu des revendications 1-16 de la présente demande de brevet est susceptible d'application industrielle dans le domaine des compléments alimentaires et de la dermatologie (Article 33(4) PCT).

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

a. La revendication 1 n'est pas claire et ne satisfait pas aux conditions requises à l'article 6 PCT, dans la mesure où l'objet pour lequel une protection est demandée n'est pas clairement défini. Telle qu'elle a été spécifiée, la définition fonctionnelle "...hydrogel étant adapté à relarguer sur plusieurs heures ces dites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain." ne permet pas à l'homme du métier de déterminer quelles sont les caractéristiques techniques nécessaires audit relargage. Cette caractéristique est donc considérée comme descriptive.

b. L'expression "un solvant approprié" utilisé dans la description, à la page 3, ligne 14, est vague et n'est pas en accord avec la revendication 8 dans laquelle il est fait usage d'éthanol pour solubiliser les vitamines en question.

c. Etant donné que la formation d'un hydrogel implique la présence d'eau, les expressions "solution de xanthane" ou "solution de chitosane" dans les revendications 8 et 9, ainsi que dans la description (exemple 1) peuvent prêter à confusion du fait du manque de précision de leur définition.

d. Les conditions d'obtention des courbes de cinétique de libération ne peuvent figurer dans la description (page 12, lignes 13-16), car il n'existe pas de support dans la demande telle que déposée pour ces explications.

e. L'ajout d'une étape supplémentaire (e) à la revendication 8, concernant les actifs liposolubles, ainsi que dans la description, à la page 3, lignes 18-19, n'est pas acceptable.

En tant que telle, elle ne correspond en effet pas aux étapes décrites dans l'exemple 2.

De plus, à la page 5, lignes 13-18, il est uniquement précisé de quelle façon les ingrédients **actifs hydrosolubles** sont introduits dans l'hydrogel.

Le mode de réalisation de l'invention décrit dans l'exemple 2, page 6, se rapportant à l'inclusion d'une vitamine liposoluble par diffusion dans un hydrogel de xanthane/chitosane, n'est pas couvert par la revendication 8.

Ce défaut de concordance entre les revendications et la description laisse planer un doute sur l'objet pour lequel une protection est demandée. La revendication 8 n'est donc pas claire (article 6 PCT).

f. Les lettres de l'alphabet grec α et μ , présentes dans la demande originale, manquent dans l'ensemble de la description modifiée.

TITRE DE L'INVENTION

**HYDROGELS POLYIONIQUES À BASE DE XANTHANE ET CHITOSANE POUR
STABILISATION ET RELARGAGE CONTRÔLÉ DES VITAMINES**

5 **DOMAINE DE L'INVENTION**

La présente invention a trait au domaine des hydrogels à base de xanthane et chitosane. Plus précisément, l'invention a trait aux domaines de l'alimentation et de la dermatologie où de tels hydrogels sont chargés de principes actifs tels vitamines, acides nucléiques, acides aminés, oligopeptides.

10

ARRIÈRE PLAN TECHNOLOGIQUE

15

Il est connu de fabriquer des hydrogels à partir de chitosane et de xanthane. Les brevets américains 5,620,706 et 5,648,252 présentent de tels hydrogels utilisés comme support inerte pour l'immobilisation d'enzymes ou pour la libération contrôlée de certains antibiotiques ou agents anti-cancer. Cependant, l'application d'hydrogels de chitosane et de xanthane pour chargement, stabilisation et relargage de vitamines, acides nucléiques, acides aminés et oligopeptides est jusqu'à présent inexplorée.

20

Une des problématiques courantes dans la fabrication de compléments alimentaires ainsi qu'en dermatologie est la conservation d'ingrédients actifs très sensibles à la dégradation tels que vitamines, acides nucléiques, acides aminés, et oligopeptides. L'exposition à la lumière et la chaleur accélère cette dégradation.

25

Compte tenu de l'important potentiel bénéfique de ces ingrédients actifs, plusieurs véhicules tels comprimés, capsules, gellules, crèmes, onguents, gels, dispersions aqueuses (émulsions) et solutions, furent développées dans le but

d'offrir une protection des produits actifs contre la dégradation ou pour les rendre hydrophobes. Cependant, plusieurs désavantages de ces préparations synthétiques, tels le potentiel irritant et la toxicité furent soulignés.

5 Faute de trouver un véhicule adéquat parmi les excipients conventionnels, l'utilisation de polycations synthétiques fut récemment proposée. Par exemple, la demande de brevet européen 504 066 A1, 1992, déposée par L'Oréal, France, propose des compositions cosmétiques contenant une dispersion de particules solides actives dont la surface est revêtue d'un polymère cationique. Cependant, le but du revêtement cationique est de
 10 rendre la composition stable dans son ensemble par opposition à stabiliser un ingrédient faisant face à une tendance à la dégradation.

Un important besoin demeure donc pour la découverte d'un nouveau véhicule utile en préparations alimentaires, cosmétologie et dermatologie pour contenir des ingrédients actifs photosensibles et thermosensibles tels vitamines, acides
 15 nucléiques, acides aminés et oligopeptides. Un des buts de la présente invention est donc d'enseigner des préparations alimentaires et dermatologiques contenant un hydrogel polyionique naturel permettant la protection d'ingrédients actifs photo et thermo sensibles sans toutefois démontrer un potentiel irritant ou toxique. Un autre but connexe est
 20 l'enseignement d'une méthode permettant l'introduction de ces ingrédients actifs dans un hydrogel polyionique naturel.

D'autres buts et objets de la présente invention deviendront apparents à la lecture de la description détaillée qui suit. Il importe de noter que cette description détaillée présente des incorporations et exemples préférentiels de
 25 l'invention et est fournie à titre d'illustration. Ceux spécialisés dans le domaine de l'invention pourront apporter plusieurs aménagements et modifications à ces incorporations et exemples préférentiels sans toutefois dépasser le cadre de la présente invention.

SOMMAIRE DE L'INVENTION

De façon générale, l'invention porte sur une composition thermo et photo stable comprenant un hydrogel formé d'un complexe de xanthane et chitosane, l'hydrogel comprenant au moins une substance thermo ou photo sensible choisie parmi les substances suivantes : vitamines, acides aminés, acides nucléiques et oligopeptides, l'hydrogel étant adapté à relarguer ces dites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain. Préférentiellement, les substances thermo ou photo sensibles seront présentes dans une proportion de 5 à 25 % du poids total de la composition. Plus
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

Préférentiellement, ces substances seront choisies parmi les vitamines A, B, C, D, E, et K.

L'invention porte aussi sur une méthode de fabrication de la composition inventive, la méthode comprenant les étapes suivantes :

- (a) la dissolution des substances liposolubles dans un solvant approprié;
- 15 (b) l'ajout de cette solution, sous agitation, à une solution de xanthane;
- (c) la pulvérisation du mélange de l'étape (b) à une solution de chitosane;
- (d) la récupération de l'hydrogel ainsi formé;
- (e) l'incorporation des substances liposolubles de l'étape (a) par diffusion dans l'hydrogel;
- 20 toutes les étapes se faisant en l'absence d'oxygène et de lumière.

Dans une autre méthode selon l'invention, la composition de l'invention pourra être obtenue par les étapes suivantes :

- (a) la pulvérisation d'une solution de xanthane dans une solution de chitosane;

- (b) la récupération de l'hydrogel ainsi formé sera caractérisée par une lyophilisation de l'hydrogel;
- (c) l'introduction du l'hydrogel lyophilisé dans une solution aqueuse comprenant les substances hydrosolubles pouvant être avantageusement stabilisées par l'ajout d'acides aminiques tels les L-cystéine, L-cystine et L-méthionine ou mélange de ces derniers ou par l'ajout de tripeptides;
- (d) incorporation des substances hydrosolubles dans l'hydrogel par diffusion des substances hydrosolubles lors du gonflement de l'hydrogel, ledit hydrogel ayant un degré de gonflage de 2000 % ou plus.
- 10 Sous un aspect additionnel, l'invention présente une méthode d'utilisation de ces hydrogels en dermatologie ou comme complément alimentaire.

BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

- Figure 1 Complexation entre le chitosane et xanthane
- 15 Figure 2 Schéma du montage pour l'étude cinétique
- Figure 3 Masse de Vitamine C libérée en fonction du temps
Échantillon codé VS2L. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 1800 %
- Figure 4 Vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps.
20 Échantillon codé VS2L
- Figure 5 Masse de vitamine C en fonction du temps
Échantillon codé VS2R. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 2200 %
- Figure 6 Vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps
25 Échantillon codé VS2R

Figure 7 Variation du pourcentage de la Vitamine C libérée en fonction
du temps
Échantillon VS2M Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à
partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 3500 %

5

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

La présente description détaillée révèle des compositions alimentaires et
dermatologiques comprenant un ou plusieurs ingrédients actifs photo ou
thermo sensibles à la dégradation. Ces compositions comprenant un hydrogel
10 polyioniques formé d'un complexe de chitosane et xanthane pouvant contenir
et protéger les ingrédients actifs photo et thermo sensibles ainsi que bonifier
leur activité par un effet de libération contrôlée.

Il est aussi décrit deux méthodes d'incorporation des ingrédients actifs dans
l'hydrogel de chitosane et xanthane. Les Ingrédients actifs liposolubles sont
15 introduits dans l'hydrogel par une première méthode lors de la fabrication de
l'hydrogel. Les ingrédients actifs hydrosolubles sont introduits par une
méthode de diffusion dans l'hydrogel faisant suite à la fabrication de
l'hydrogel.

La présente invention démontre, de façon surprenante et innovatrice la
20 possibilité d'introduire diverses vitamines ou autres ingrédients tels acides
aminés, acides nucléiques et oligopeptides dans un hydrogel pour ensuite
relarguer ses substances par différentes voies, tels doses orales, suppositoires,
crèmes, onguents, gels, solutions, dispositifs transcutanés ("patch"). Par
surcroît, la présente invention révèle la possibilité d'introduire et de solubiliser
25 dans un même hydrogel des vitamines liposolubles ou hydrosolubles.

Finalement, il est aussi décrit une méthode de fabrication d'un complément
alimentaire et d'une crème dermatologique incorporant l'hydrogel de la
présente invention.

Il est à noter que les termes "dermatologie" et "dermatologique" sont employés dans leur sens large incluant ainsi toutes applications cosmétologique et cosmétique. De plus, ces termes s'étendent à des applications sur la peau ou sur les phanères.

- 5 Le terme "complément alimentaire" s'entend aussi dans son sens large incluant ainsi toute préparation alimentaire, le complément étant utilisé dans un rôle nutritionnel ou thérapeutique ou encore dans un simple rôle physique dans la préparation alimentaire, par exemple, en tant qu'agent texturant, de remplissage ou de contrôle de viscosité.
- 10 Les compositions de la présente invention sont destinés principalement au humains mais peuvent aussi avoir application dans le domaine vétérinaire.

- Se référant à la figure 1, il est constaté que l'hydrogel utilisé dans la présente invention est un complexe à base de chitosane et xanthane issu d'une réaction ionique entre ces deux polyions. Une méthode de fabrication de l'hydrogel
- 15 est décrite dans le brevet américain 5,720,206 accordé au même cessionnaire que la présente demande. Tel qu'illustré dans la figure 1, le xanthane et le chitosane forme un complexe c'est-à-dire l'établissement de divers liens ioniques entre les molécules de chitosane et de xanthane formant ainsi l'hydrogel.

20

Inclusion de vitamines liposolubles dans l'hydrogel chitosane-xanthane

vitamine A

- La vitamine A (Retinol) est un produit très sensible à la lumière et à l'oxygène. L'utilisation de ce produit dans une crème à titre d'exemple, ne peut se faire
- 25 que si le produit est préalablement stabilisé contre les effets négatifs des agents précités. La méthode de la présente invention consiste à stabiliser la vitamine

A dans un hydrogel composé de xanthane et de chitosane préparé selon la méthode décrite dans le brevet américain 5,620,706.

Exemple 1 inclusion de la vitamine A durant la fabrication

Une solution (100 ml) de vitamine A (10 - 20 % w/v) dans l'alcool éthylique a
5 d'abord été préparée. Cette solution est ajoutée, sous forte agitation, à 500 ml
d'une solution de xanthane, 0,65 % w/v, pour obtenir une concentration finale
en vitamine A de 1,66 - 3,33% w/v. La solution peut être conservée à 3 °C.
Par la suite, un système de pulvérisation est utilisé pour ajouter la solution de
vitamine A - xanthane à 800 ml d'une solution de chitosane 0,65 % w/v. La
10 réaction doit se poursuivre pendant 30 min. Le gel formé doit être filtré et lavé
avec de l'eau pour atteindre un pH de 6.8. Pour augmenter la stabilité finale
du gel, un dernier lavage avec une solution de bicarbonate de sodium 1 % w/v
amène le gel à un pH de 7.5. Le gel est par la suite congelé et lyophilisé.
Toutes les opérations, incluant la congélation, se font en l'absence d'oxygène
15 et de lumière.

Exemple 2 Inclusion de la vitamine A par diffusion

En utilisant un hydrogel à base de xanthane-chitosane possédant un degré de gonflage () d'au minimum 2000% il est possible d'introduire la vitamine A par diffusion. Le degré de gonflage se définit selon la formule suivante:

20
$$= 100\% \times \frac{\text{masse d'hydrogel gonflé à l'équilibre} - \text{masse d'hydrogel sec}}{\text{masse d'hydrogel sec}}$$

Dans ces conditions, on diminue de façon importante le temps de manipulation prévenant ainsi la dégradation de la molécule. Pour ce faire, il suffit de dissoudre 0,07 g de Vitamine A dans 1 ml d'alcool éthylique (96%) et
25 d'y ajouter 1,5 g du complexe xanthan-chitosane lyophilisé avec = 2500 %.
Une légère agitation permet d'obtenir une pâte homogène. On ajoute alors 2

ml d'alcool éthylique et 200 l d'eau toujours sous légère agitation et on place le tout à 4°C pendant 24 h à l'abri de la lumière. L'alcool est par la suite évaporé à 4°C. Le produit fini possède une concentration de 46 mg de Vitamine A / g produit lyophilisé.

5 Exemple 3 Inclusion de la vitamine E

Pour l'incorporation de la Vitamine E, la méthode (1) développée pour la vitamine A est appliquée. La concentration en vitamine E peut atteindre jusqu'à 20 %.

Exemple 4 Inclusion de la vitamine K

- 10 En ce qui concerne la vitamine K, la même méthode (1) que pour la vitamine A avec une concentration de vitamine K pouvant atteindre 20 %.

Inclusions de vitamines solubles dans l'eau

- 15 Pour les produits bioactifs solubles dans l'eau il est préférable d'utiliser la méthode de diffusion dans l'hydrogel lyophilisé pour éviter les pertes inévitables de produits pendant la réaction entre le xanthane et le chitosane. Il est nécessaire dans cette condition d'avoir une hydrogel avec une degré de gonflage d'au minimum 2000 %.

Exemple 5 Inclusion de la vitamine C

- 20 Parce que la vitamine C présente une forte action oxydo-réductrice en regard du chitosane, une nouvelle méthode d'inclusion a été développée. Cette méthode comprend deux (2) étapes :

Étape 1 La préparation du complexe xanthane-chitosane (CHITOXAN^{MC}), c'est-à-dire l'hydrogel polyionique;

Étape 2 L'incorporation de la Vitamine C.

1- Préparation du complexe xanthane-chitosane

Le complexe CHITOXAN^{MC} se prépare par la méthode décrite antérieurement, soit celle du brevet américain 5,620,706 . Le chitosane utilisé pour préparer ce complexe a typiquement un poids moléculaire compris entre 250,000 et 350,000, et l'hydrogel un 2000%.

Le CHITOXAN^{MC} est moulu pour obtenir une fine poudre avec des particules ayant un diamètre compris entre 250 et 500 m.

2- Incorporation de la vitamine C

2a. Stabilisation par acides aminiques

- À 10 ml d'eau, on ajoute 1 g de vitamine C, 0,06 g de L-cystéine, 0,02 g de L-cystine, 0,02 g de L-méthionine. Par la suite, on ajoute 1 g du CHITOXAN^{MC} lyophilisé avec des particules de 250 - 500 m. Le mélange ne doit pas présenter de phase liquide en excès. Si nécessaire, de l'eau peut être ajoutée. On maintient le mélange pendant 2 hrs pour arriver à l'équilibre d'hydratation.
- Toutes les opérations doivent se faire en l'absence de lumière. Le mélange est par la suite congelé et lyophilisé. La transformation en poudre du produit final donne des particules variant entre 50 et 125 m.

- La vitamine C ainsi incorporée et hydratée présente une stabilité, sans aucun changement de coloration, de 2 semaines à 45 °C et de 20 semaines pour le gel sec à cette même température. Il est possible d'utiliser comme agent de stabilisation, de l'acide tartrique 0,1 %, de l'acide métaphosphorique 0,03 % ou de l'acide citrique 0,1 %. Le pourcentage pondéral est par rapport au complexe CHITOXAN^{MC}.

2b. Stabilisation par tripeptides

- On utilise la méthode 2a, en remplaçant les acides-aminés par le tripeptide avec acides aminiques sulfurés. À 10 ml d'eau, on ajoute 1 g de vitamine C et

0,002 g de glutathione. Après 5 minutes d'agitation on introduit 1 g
CHITOXAN^{MC} et on agite légèrement jusqu'à l'obtention d'une pâte
homogène. On laisse en repos pendant 2 hrs pour arriver à l'équilibre
d'hydratation. La pâte est congelée et lyophilisée. Toutes les opérations
5 doivent se faire en l'absence de lumière.

Extraction et dosage de la vitamine C incluse dans le CHITOXAN^{MC}

Extraction

Solvant d'extraction : solution aqueuse d'acide métaphosphorique 3 % (w/v),
8 % acide acétique (v/v)

10 Méthode : Dans un tube à centrifuger de 50 ml protégé contre la lumière,
on introduit de 20 jusqu'à 30 mg de CHITOXAN^{MC} + Vit. C lyophilisé et
40 ml du solvant d'extraction. Agiter pendant 60 min avec un barreau
magnétique. Finalement, la suspension est centrifugée (4000 rpm) et le
surnageant est analysé.

Détermination quantitative de la vitamine C

Avant de procéder à la détermination quantitative de la vitamine C, il faut
mesurer le maximum d'absorption dans un spectrophotomètre UV-VIS. Le
standard se prépare en utilisant une solution de vitamine C, qui a servi à la
fabrication du CHITOXAN^{MC}-Vit. C, dans le solvant d'extraction. Notre test a
20 donné un maximum d'absorption à 243 nm pour la vitamine C type
ALDRICH, pureté 98 %

Après avoir évalué le maximum d'absorption, on détermine la courbe étalon
(absorption en fonction de la concentration de la vitamine C). Dans une fiole
jaugée, on prépare une solution de vitamine C dans le solvant d'extraction à
25 une concentration de 1,3 mg / ml. La solution est préparée juste avant de

procéder à l'analyse. Par dilution successive, on mesure la dépendance absorption / concentration (mg / ml).

La concentration du surnageant obtenu dans l'extraction est déterminée par photocolorimétrie à 243 nm et calculée à partir de la courbe étalon.

- 5 La concentration de la vitamine C dans l'échantillon préparé par la méthode 2a est de 49.6%.

Inclusion du CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une base de crème

- 10 1 g de Chitoxan^{MC}-Vit. C est hydraté avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'une pâte crémeuse. Par la suite, il suffit de peser la pâte et de calculer la concentration donnée en vitamine C. Subséquemment, la pâte est introduite sous forte agitation dans la base de crème pour obtenir une concentration finale désirée en vitamine, préférablement de 5 à 25% poids.
- 15 **Détermination de la stabilité de la vitamine C incluse dans une base de crème**
- 20 10 g de la préparation obtenue par inclusion de CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une base crème est introduite dans un tube protégé de la lumière. Ce tube est par la suite chauffé à 45°C. Pour déterminer le taux de dégradation de la vitamine C dans la base de crème, on prend un échantillon qui correspond à environ 10 - 30 mg de vitamine C. Cet échantillon est pris à chaque jour et ce pendant les 4 premiers jours et par la suite à tous les 2 jours pour un total de 30 jours. Si les échantillons ne sont pas analysés tout de suite, ils doivent être conservés au congélateur (-4°C).
- 25 Les échantillons prélevés sont analysés de la manière décrite précédemment (toujours en utilisant le solvant d'extraction).

Le solvant (mélange 3 % w/v acide métaphosphorique et 8 % w/v acide acétique) pénètre par le tuyau central directement dans le réacteur où il entre en contact avec le CHITOXAN^{MC}-Vitamine C. La vitamine C se libère graduellement du complexe et entre en solution dans le solvant. Le solvant s'échappe du réacteur par les petits orifices et se retrouve dans le tube extérieur. Avec cette méthode, on assure une circulation constante de solvant autour de l'échantillon à analyser.

Se référant maintenant à la figure 3, il est vu que la masse de vitamine C libérée montre une relation linéaire en fonction du temps (cinétique d'ordre zéro) avec une cassure nette après 60 minutes dans le cas du CHITOXAN^{MC}-Vit. C de type VS2L et 40 minutes dans le cas du CHITOXAN^{MC}-Vitamine C type VS2R.

Se référant maintenant à la figure 4, il est vu dans un premier cas (CHITOXAN^{MC}-Vit. C de type VS2L) que la vitamine C diffuse à une vitesse constante de 0.36 mg/min pendant la première période, puis la vitesse diminue de moitié pour les 100 minutes suivantes.

Dans le deuxième cas illustré aux figures 5 et 6 la diffusion s'effectue beaucoup plus rapidement dans les 40 premières minutes avec une vitesse de 1.18 mg/min, puis elle est presque nulle avec une valeur de 0,02 mg/min. La figure 5 montre la masse de vitamine C en fonction du temps pour l'échantillon codé VS2R. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 2200 %. La figure 6 montre la vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps pour l'échantillon codé VS2R.

La figure 7 montre la variation du pourcentage de la Vitamine C libérée en fonction du temps pour un échantillon VS2M Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage () = 3500 %. Pour

cet échantillon, une libération de 85 % de la vitamine C dans les premiers 10 minutes d'élution fut constatée.

Inclusion du CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une préparation alimentaire

- 5 L'Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C et d'autres hydrogels chitosane-xanthane contenant vitamines, acides nucléiques, acides aminés et oligopeptides peuvent aussi être utilisés dans des préparations alimentaires hydratées telles que gelées, sauces et sirops ainsi que dans des préparations déshydratées.

- 10 Les caractéristiques physiques de l'hydrogel chitosane-xanthane choisi détermineront la structure et la texture plus ou moins visqueuse de l'hydrogel. Ce choix d'hydrogel selon la présente invention permettra donc d'adapter l'hydrogel à diverses applications alimentaires.

- 15 Par surcroît, la présente invention comporte la mise en pastille de la poudre CHITOXAN-Vit. C avec d'autres ingrédients actifs, si requis. Il est aussi prévu la mise en pastille d'une poudre lyophilisée d'autres hydrogels chitosane-xanthane contenant vitamines diverses, acides aminés, acides nucléiques, oligopeptides ou une combinaison parmi ces ingrédients actifs.

Il va de soi que la présente demande peut recevoir aménagements et variantes sans pour autant sortir du cadre de la présente invention telle que décrite.

REVENDICATIONS :

1. Composition thermo et photo stable comprenant un hydrogel formé d'un complexe de xanthane et chitosane, ledit hydrogel comprenant au moins une substance thermo ou photo sensible choisie parmi les substances
5 suivantes: vitamines, acides aminés, acides nucléiques et tripeptides, ledit hydrogel étant adapté à relarguer sur plusieurs heures ces dites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain.
2. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances thermo ou photo sensible sont des vitamines dans une proportion de 5 à 25%
10 du poids total de la composition.
3. Composition selon la revendication 2 dans laquelle les vitamines sont choisies parmi les vitamines A, B, C, D, E et K.
4. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la vitamine est la vitamine A.
- 15 5. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la vitamine est la vitamine C.
6. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances thermo et photo sensibles sont aussi liposolubles.
7. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances
20 thermo et photo sensibles sont aussi hydrosolubles.
8. Méthode de fabrication de la composition de la revendication 6 comprenant les étapes suivantes:
 - (a) la dissolution des substances liposolubles dans l'alcool éthylique;

- (b) l'ajout de cette solution, sous agitation, à une solution de xanthane;
- (c) la pulvérisation du mélange de l'étape (b) à une solution aqueuse de chitosane;
- 5 (d) la récupération de l'hydrogel ainsi formé;
- (e) l'incorporation des substances liposolubles dans l'hydrogel par diffusion des substances liposolubles dissoutes dans l'éthanol (95%/vol) et ce à une concentration de 50%/vol.

toutes les étapes se faisant en l'absence d'oxygène et de lumière.

- 10 9. Méthode de fabrication de la composition de la revendication 7 comprenant les étapes suivantes:

- (a) la pulvérisation d'une solution de xanthane dans une solution de chitosane;
- 15 (b) la récupération de l'hydrogel ainsi formé, cette récupération étant caractérisée par une lyophilisation de l'hydrogel;
- (c) l'introduction du l'hydrogel lyophilisé dans une solution aqueuse comprenant les substances hydrosolubles;
- 20 (d) incorporation des substances hydrosolubles dans l'hydrogel par diffusion des substances hydrosolubles lors du gonflement de l'hydrogel, ledit hydrogel ayant un degré de gonflage de 2000 % ou plus.

10. La méthode de fabrication de la revendication 9 dans laquelle, lors de l'étape (c), la stabilisation des substances hydrosolubles est favorisée par l'ajout d'acides aminiques.

11. La méthode de la revendication 10 dans laquelle les acides aminiques sont choisis parmi les L-cystéine, L-cystine et L-méthionine ou mélange de ces derniers.
- 5 12. La méthode de fabrication de la revendication 9 dans laquelle, lors de l'étape (c), la stabilisation des substances hydrosolubles est favorisée par l'ajout de tripeptides.
13. L'utilisation de la composition de l'une ou l'autre des revendications 1 à 7 dans la fabrication d'un produit dermatologique.
- 10 14. L'utilisation de la revendication 13 dans laquelle le produit dermatologique est une crème.
15. L'utilisation de la revendication 14 dans laquelle la substance thermo et photo sensible est la vitamine A.
16. L'utilisation de la composition de l'une ou l'autre des revendications 1 à 7 dans la fabrication d'un complément alimentaire.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

8

Applicant's or agent's file reference AML/12616.12	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/CA99/00651	International filing date (day/month/year) 16 July 1999 (16.07.99)	Priority date (day/month/year) 17 July 1998 (17.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08L 5/08		
Applicant KEMESTRIE INC.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>17</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 16 February 2000 (16.02.00)	Date of completion of this report 25 October 2000 (25.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/CA99/00651

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages _____, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages 1-14, filed with the letter of 14 July 2000 (14.07.2000),
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 9-16, filed with the letter of 14 July 2000 (14.07.2000),
Nos. 1-8, filed with the letter of 28 September 2000 (28.09.2000).
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following document:

D1: US-A-5 620 706 (DUMITRIU ET AL.) 15 April 1997,
cited in the application

1. Novelty

The subject matter of Claims 1-16 is considered novel over the available prior art (PCT Article 33(2)).

D1 describes a method for preparing, by complexing xanthan and chitosan, a hydrogel used to immobilize biologically active compounds, such as **proteins and enzymes**, which are then released by diffusion. The **biological activity** of these substances is thus protected, or even increased (column 1, lines 57-62). Furthermore, whereas the enzyme activity of the xylanase and the protease increases following immobilization in the xanthan/chitosan gel, the **heat stability** of the xylanase increases while that of the protease decreases (column 13, lines 3-8).

The method for preparing the hydrogel comprises adding enzymes to an aqueous solution of xanthan in

concentrations from 0.5 to 1.8% by weight. The solution thus obtained is then agitated at 15° C for 15 minutes and added dropwise via a syringe to a chitosan solution. The pH of the solution is then adjusted according to the type of enzyme used. The microspheres thus obtained are agitated for 15 minutes at ambient temperature (20-29° C) and washed with an acetate buffer solution (column 6, lines 24-37).

The hydrogel thus prepared can be used for applying substances to the skin, particularly by means of patches, since they are stable in the physiological pH ranges (column 12, lines 57-62).

The difference between the present application and D1 is the use of vitamins, amino acids, nucleic acids and tripeptides, instead of proteins and enzymes, for immobilization in the xanthan and chitosan hydrogel.

2. Inventive step

- (a) The subject matter of Claims 1-7 is inventive (PCT Article 33(3)).

D1 is considered the closest prior art.

The compositions of Claims 1-7 differ from those described in D1 mainly by virtue of the type of compound added to the hydrogel made of a chitosan and xanthan complex.

The problem addressed by the present invention can therefore be considered that of finding other

biologically active compounds able to be immobilized by said hydrogel, whereby the hydrogel protects said compounds from heat and light.

The solution to this problem, proposed in Claims 1-7, is inventive.

The hydrogel of D1 does protect or increase the biological activity of the immobilized enzymes and proteins (column 1, lines 58-62). However, it does not provide the heat stability claimed in the present application for all the types of enzymes. The heat stability and enzymatic activity of xylanase, for example, are increased by immobilization in the xanthan/chitosan hydrogel. The enzymatic activity of the protease is maintained via immobilization in the hydrogel, but the heat stability decreases (column 13, lines 4-5).

D1 therefore does not enable a general tendency to be established regarding the effect of the hydrogel on the heat stability of the enzymes immobilized therein.

Moreover, D1 mentions the use of said hydrogel as a medium for other substances (drugs, eukaryotic and prokaryotic cells, polybasic pharmaceutical substances, column 7, lines 2-38), enabling the controlled release of said substances, but does not in any way suggest protecting against heat and light.

A person skilled in the art, recognizing that compounds with similar structures and activities have opposite reactions to heat when they are

included in the xanthan/chitosan hydrogel, therefore cannot predict whether or not the structurally different compounds included in this same gel will have heat stability.

Therefore, the subject matter of Claims 1-7 is not technically obvious to a person skilled in the art and consequently involves an inventive step (PCT Article 33(3)).

- (b) The methods for synthesizing the thermo- and photostable compositions of Claims 8-12, as well as the uses of the compositions as claimed in Claims 14-16, are therefore also inventive.

3. Industrial applicability

The content of Claims 1-16 of the present patent application is industrially applicable in the fields of food supplements and dermatology (PCT Article 33(4)).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- (a) Claim 1 is not clear and does not meet the requirements of PCT Article 6, since the subject matter for which protection is sought has not been clearly defined. As specified, the functional definition "...hydrogel designed for the release of said thermo- or photo-sensitive substances in an animal or human subject over a period of several hours" does not enable a person skilled in the art to determine which technical features are necessary for said release. This feature is therefore considered descriptive.
- (b) The expression "an appropriate solvent", used on page 3, line 14, of the description, is vague and inconsistent with Claim 8, in which ethanol is used to solubilize the vitamins in question.
- (c) Given that the formation of a hydrogel involves the presence of water, the expressions "xanthan solution" or "chitosan solution" in Claims 8 and 9 and in the description (Example 1) can lead to confusion owing to the insufficiently precise definitions thereof.
- (d) The conditions for obtaining release kinetics curves cannot be included in the description (page 12, lines 13-16), because there is nothing in the application as filed to support these explanations.
- (e) It is unacceptable to add an additional step (e) to Claim 8, which relates to fat-soluble active

VIII. Certain observations on the international application

ingredients, and to page 3, lines 18-19, of the description.

Said step, as such, does not correspond to the steps described in Example 2.

Furthermore, on page 5, lines 13-18, all that is specified is how the **water-soluble active ingredients** are introduced into the hydrogel.

The embodiment of the invention described in Example 2, page 6, relating to the inclusion of a fat-soluble vitamin by diffusion in a xanthan/chitosan hydrogel, is not covered by Claim 8.

This lack of consistency between the claims and the description casts doubt on the subject matter for which protection is sought. Claim 8 is therefore not clear (PCT Article 6).

- (f) The letters α and μ of the Greek alphabet, used in the original application, are missing from the entire amended description.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C08L 5/08, 5/00, A23L 1/302, 1/303, A61K 9/06, 31/07, 47/36	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/04086 (43) Date de publication internationale: 27 janvier 2000 (27.01.00)
---	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/CA99/00651

(22) Date de dépôt international: 16 juillet 1999 (16.07.99)

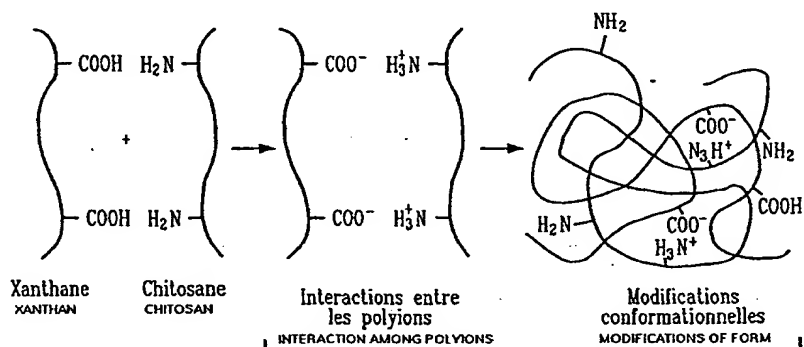
(30) Données relatives à la priorité:
2,243,619 17 juillet 1998 (17.07.98) CA(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): KEMESTRIE
INC. [CA/CA]; 4245 rue Garlock, Sherbrooke, Québec J1L
2C8 (CA).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHORNET, Esteban
[CA/CA]; 470, rue Montmagny, Sherbrooke, Québec J1L
IH3 (CA). DUMITRIU, Severian [CA/CA]; 750 McGregor,
Sherbrooke, Québec J1L 1V7 (CA).(74) Mandataires: DUBUC, Jean, H. etc.; Goudreau Gage Dubuc &
Martineau Walker, Tour de la Bourse, 800 Place Victoria,
Bureau 3400, P.O. Box 242, Montréal, Québec H4Z 1E9
(CA).(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP,
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL,
SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: POLYIONIC HYDROGELS BASED ON XANTHAN AND CHITOSAN FOR STABILISING AND CONTROLLED
RELEASE OF VITAMINS(54) Titre: HYDROGELS POLYIONIQUES A BASE DE XANTHANE ET CHITOSANE POUR STABILISATION ET RELARGAGE
CONTROLE DES VITAMINES

Hydrogels polyioniques POLYIONIC HYDROGELS

(57) Abstract

The invention generally concerns a thermostable and photostable composition comprising a hydrogel formed by a xanthan and chitosan complex, the hydrogel comprising at least a thermosensitive or photosensitive substance selected among the following substances: vitamins, amino acids, nucleic acids and polypeptides, the hydrogel being adapted to release said thermosensitive and photosensitive substances in an animal or human subject. The invention also concerns a method for making said hydrogels. The invention further concerns a method for using said hydrogels in dermatology or as nutritional supplement.

(57) Abrégé

De façon générale, l'invention porte sur une composition thermo et photo stable comprenant un hydrogel formé d'un complexe de xanthane et chitosane, l'hydrogel comprenant au moins une substance thermo ou photo sensible choisie parmi les substances suivantes: vitamines, acides aminés, acides nucléiques et polypeptides, l'hydrogel étant adapté à relarguer cesdites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain. Sous un autre aspect, l'invention présente une méthode de fabrication de ces hydrogels. Sous un aspect additionnel, l'invention présente une méthode d'utilisation de ces hydrogels en dermatologies ou comme supplément alimentaire.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

TITRE DE L'INVENTION

HYDROGELS POLYIONIQUES À BASE DE XANTHANE ET CHITOSANE POUR STABILISATION ET RELARGAGE CONTRÔLÉ DES VITAMINES

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention a trait au domaine des hydrogels à base de xanthane et chitosane. Plus précisément, l'invention a trait aux domaines de l'alimentation et de la dermatologie où de tels hydrogels sont chargés de principes actifs tels vitamines, acides nucléiques, acides aminés, polypeptides, etc.

ARRIÈRE PLAN TECHNOLOGIQUE

Il est connu de fabriquer des hydrogels à partir de chitosane et de xanthane. Les brevets américains 5,620,706 et 5,648,252 présentent de tels hydrogels utilisés comme support inerte pour l'immobilisation d'enzymes ou pour la libération contrôlée de certains antibiotiques ou agents anti-cancer. Cependant, l'application d'hydrogels de chitosane et de xanthane pour chargement, stabilisation et relargage de vitamines, acides nucléiques, acides aminés et polypeptides est jusqu'à présent inexplorée.

Une des problématiques courantes dans la fabrication de suppléments alimentaires ainsi qu'en dermatologie est la conservation d'ingrédients actifs très sensibles à la dégradation tels que vitamines, acides nucléiques, acides aminés, et polypeptides. L'exposition à la lumière et la chaleur accélère cette dégradation.

Compte tenu de l'important potentiel bénéfique de ces ingrédients actifs, plusieurs véhicules tels comprimés, capsules, gellules, crèmes, onguents, gels, dispersions aqueuses (émulsions) et solutions, furent développées dans le but d'offrir une protection des produits actifs contre la dégradation ou pour les rendre hydrophobes. Cependant, plusieurs désavantages de ces préparations synthétiques, tels le potentiel irritant et la toxicité furent soulignés.

Faute de trouver un véhicule adéquat parmi les excipients conventionnels, l'utilisation de polycations synthétiques fut récemment proposée. Par exemple,

la demande de brevet européen 504 066 A1, 1992, déposée par L'Oréal, France, propose des compositions cosmétiques contenant une dispersion de particules solides actives dont la surface est revêtue d'un polymère cationique. Cependant, le but du revêtement cationique est de rendre la composition stable dans son ensemble par opposition à stabiliser un ingrédient faisant face à une tendance à la dégradation.

Un important besoin demeure donc pour la découverte d'un nouveau véhicule utile en préparations alimentaires, cosmétologie et dermatologie pour contenir des ingrédients actifs photosensibles et thermosensibles tels vitamines, acides nucléiques, acides aminés et polypeptides. Un des buts de la présente invention est donc d'enseigner des préparations alimentaires et dermatologiques contenant un hydrogel polyionique naturel permettant la protection d'ingrédients actifs photo et thermo sensibles sans toutefois démontrer un potentiel irritant ou toxique. Un autre but connexe est l'enseignement d'une méthode permettant l'introduction de ces ingrédients actifs dans un hydrogel polyionique naturel.

D'autres buts et objets de la présente invention deviendront apparents à la lecture de la description détaillée qui suit. Il importe de noter que cette description détaillée présente des incorporations et exemples préférentiels de l'invention et est fournie à titre d'illustration. Ceux spécialisés dans le domaine de l'invention pourront apporter plusieurs aménagements et modifications à ces incorporations et exemples préférentiels sans toutefois dépasser le cadre de la présente invention.

SOMMAIRE DE L'INVENTION

De façon générale, l'invention porte sur une composition thermo et photo stable comprenant un hydrogel formé d'un complexe de xanthane et chitosane, l'hydrogel comprenant au moins une substance thermo ou photo sensible choisie parmi les substances suivantes: vitamines, acides aminés, acides nucléiques et polypeptides, l'hydrogel étant adapté à relarguer cesdites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain.

Sous un autre aspect, l'invention présente une méthode de fabrication de ces hydrogels.

Sous un aspect additionnel, l'invention présente une méthode d'utilisation de ces hydrogels en dermatologie ou comme supplément alimentaire.

5 **BREVE DESCRIPTION DES FIGURES**

Figure 1 Complexation entre le chitosane et xanthane

Figure 2 Schéma du montage pour l'étude cinétique

10 Figure 3 Masse de Vitamine C libérée en fonction du temps
Échantillon codé VS2L. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à
partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage (α) = 1800 %

Figure 4 Vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps.
Échantillon codé VS2L

15 Figure 5 Masse de vitamine C en fonction du temps
Échantillon codé VS2R. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à
partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage (α) = 2200 %

Figure 6 Vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps
Échantillon codé VS2R

20 Figure 7 Variation du pourcentage de la Vitamine C libérée en fonction du
temps
Échantillon VS2M Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de
CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage (α) = 3500 %

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

La présente description détaillée révèle des compositions alimentaires et dermatologiques comprenant un ou plusieurs ingrédients actifs photo ou thermo sensibles à la dégradation. Ces compositions comprenant un hydrogel polyioniques formé d'un complexe de chitosane et xanthane pouvant contenir et protéger les ingrédients actifs photo et thermo sensibles ainsi que bonifier leur activité par un effet de libération contrôlée.

Il est aussi décrit deux méthodes d'incorporation des ingrédients actifs dans l'hydrogel de chitosane et xanthane. Les ingrédients actifs liposolubles sont introduits dans l'hydrogel par une première méthode lors de la fabrication de l'hydrogel. Les ingrédients actifs hydrosolubles sont introduits par une méthode de diffusion dans l'hydrogel faisant suite à la fabrication de l'hydrogel.

La présente invention démontre, de façon surprenante et innovatrice la possibilité d'introduire diverses vitamines ou autres ingrédients tels acides aminés, acides nucléiques et polypeptides dans un hydrogel pour ensuite relarguer ses substances par différentes voies, tels doses orales, suppositoires, crèmes, onguents, gels, solutions, dispositifs transcutanés ("patch"). Par surcroît, la présente invention révèle la possibilité d'introduire et de solubiliser dans un même hydrogel des vitamines liposolubles ou hydrosolubles.

Finalement, il est aussi décrit une méthode de fabrication d'un supplément alimentaire et d'une crème dermatologique incorporant l'hydrogel de la présente invention.

Il est à noter que les termes "dermatologie" et "dermatologique" sont employés dans leur sens large incluant ainsi toutes applications cosmétologique et cosmétique. De plus, ces termes s'étendent à des applications sur la peau ou sur les phanères.

Le terme "supplément alimentaire" s'entend aussi dans son sens large incluant ainsi toute préparation alimentaire, le supplément étant utilisé dans un rôle nutritionnel

ou thérapeutique ou encore dans un simple rôle physique dans la préparation alimentaire, par exemple, en tant qu'agent texturant, de remplissage ou de contrôle de viscosité.

Les compositions de la présente invention sont destinées principalement au humains
5 mais peuvent aussi avoir application dans le domaine vétérinaire.

Se référant à la figure 1, il est constaté que l'hydrogel utilisé dans la présente invention est un complexe à base de chitosane et xanthane issu d'une réaction ionique entre ces deux polyions. Une méthode de fabrication de l'hydrogel est décrite dans le brevet américain 5,720,206 accordé au même cessionnaire que la
10 présente demande. Tel qu'illustré dans la figure 1, le xanthane et le chitosane forme un complexe c'est-à-dire l'établissement de divers liens ioniques entre les molécules de chitosane et de xanthane formant ainsi l'hydrogel.

Inclusion de vitamines liposolubles dans l'hydrogel chitosane-xanthane vitamine A

15 La vitamine A (Retinol) est un produit très sensible à la lumière et à l'oxygène. L'utilisation de ce produit dans une crème à titre d'exemple, ne peut se faire que si le produit est préalablement stabilisé contre les effets négatifs des agents précités. La méthode de la présente invention consiste à stabiliser la vitamine A dans un hydrogel composé de xanthane et de chitosane préparé selon la méthode
20 décrite dans le brevet américain 5,620,706.

Exemple 1 inclusion de la vitamine A durant la fabrication

Une solution (100 ml) de vitamine A (10 - 20 % w/v) dans l'alcool éthylique a d'abord été préparée. Cette solution est ajoutée, sous forte agitation, à 500 ml d'une solution de xanthane, 0,65 % w/v, pour obtenir une concentration finale en
25 vitamine A de 1,66 - 3,33% w/v. La solution peut être conservée à 3 °C. Par la suite, un système de pulvérisation est utilisé pour ajouter la solution de vitamine A - xanthane à 800 ml d'une solution de chitosane 0,65 % w/v. La réaction doit se poursuivre pendant 30 min. Le gel formé doit être filtré et lavé avec de l'eau

pour atteindre un pH de 6.8. Pour augmenter la stabilité finale du gel, un dernier lavage avec une solution de bicarbonate de sodium 1 % w/v amène le gel à un pH de 7.5. Le gel est par la suite congelé et lyophilisé. Toutes les opérations, incluant la congélation, se font en l'absence d'oxygène et de lumière.

5 Exemple 2 Inclusion de la vitamine A par diffusion

En utilisant un hydrogel à base de xanthane-chitosane possédant un degré de gonflage (α) d'au minimum 2000% il est possible d'introduire la vitamine A par diffusion. Le degré de gonflage se définit selon la formule suivante:

10
$$\alpha = 100\% \times \frac{\text{masse d'hydrogel gonflé à l'équilibre} - \text{masse d'hydrogel sec}}{\text{masse d'hydrogel sec}}$$

15 Dans ces conditions, on diminue de façon importante le temps de manipulation prévenant ainsi la dégradation de la molécule. Pour ce faire, il suffit de dissoudre 0,07 g de Vitamine A dans 1 ml d'alcool éthylique (96%) et d'y ajouter 1,5 g du complexe xanthan-chitosane lyophilisé avec $\alpha = 2500\%$. Une légère agitation permet d'obtenir une pâte homogène. On ajoute alors 2 ml d'alcool éthylique et 200 μ l d'eau toujours sous légère agitation et on place le tout à 4 °C pendant 24 h à l'abri de la lumière. L'alcool est par la suite évaporé à 4 °C. Le produit fini possède une concentration de 46 mg de Vitamine A / g produit lyophilisé.

20 Exemple 3 Inclusion de la vitamine E

Pour l'incorporation de la Vitamine E, la méthode (1) développée pour la vitamine A est appliquée. La concentration en vitamine E peut atteindre jusqu'à 20 %.

25 Exemple 4 Inclusion de la vitamine K

En ce qui concerne la vitamine K, la même méthode (1) que pour la vitamine A avec une concentration de vitamine K pouvant atteindre 20 %.

25 Inclusions de vitamines solubles dans l'eau

Pour les produits bioactifs solubles dans l'eau il est préférable d'utiliser la méthode de diffusion dans l'hydrogel lyophilisé pour éviter les pertes inévitables de produits

pendant la réaction entre le xanthane et le chitosane. Il est nécessaire dans cette condition d'avoir un hydrogel avec un degré de gonflement d'au minimum 2000 %.

Exemple 5 Inclusion de la vitamine C

- 5 Parce que la vitamine C présente une forte action oxydo-réductrice en regard du chitosane, une nouvelle méthode d'inclusion a été développée. Cette méthode comprend deux (2) étapes :

- | | | |
|----|---------|---|
| 10 | Étape 1 | La préparation du complexe xanthane-chitosane (CHITOXAN ^{MC}), c'est-à-dire l'hydrogel polyionique; |
| | Étape 2 | L'incorporation de la Vitamine C |

1- Préparation du complexe xanthane-chitosane

- 15 Le complexe CHITOXAN^{MC} se prépare par la méthode décrite antérieurement, soit celle du brevet américain 5,620,706. Le chitosane utilisé pour préparer ce complexe a typiquement un poids moléculaire compris entre 250,000 et 350,000, et l'hydrogel un $\alpha \geq 2000\%$.

Le CHITOXAN^{MC} est moulu pour obtenir une fine poudre avec des particules ayant un diamètre compris entre 250 et 500 μm .

2- Incorporation de la vitamine C

- 20 2a. Stabilisation par acides aminiques

- À 10 ml d'eau, on ajoute 1 g de vitamine C, 0,06 g de L-cystéine, 0,02 g de L-cystine, 0,02 g de L-méthionine. Par la suite, on ajoute 1 g du CHITOXAN^{MC} lyophilisé avec des particules de 250 \div 500 μm . Le mélange ne doit pas présenter de phase liquide en excès. Si nécessaire, de l'eau peut être ajoutée. On maintient le mélange pendant 2 hrs pour arriver à l'équilibre d'hydratation. Toutes les opérations doivent se faire en l'absence de lumière. Le mélange est par la suite congelé et lyophilisé. La transformation en poudre du produit final donne des particules variant entre 50 et 125 μm .

La vitamine C ainsi incorporée et hydratée présente une stabilité, sans aucun changement de coloration, de 2 semaines à 45 °C et de 20 semaines pour le gel sec à cette même température. Il est possible d'utiliser comme agent de stabilisation, de l'acide tartrique 0,1 %, de l'acide métaphosphorique 0,03 % ou de l'acide citrique 0,1 %. Le pourcentage pondéral est par rapport au complexe CHITOXAN^{MC}.

2b. Stabilisation par tripeptides

On utilise la méthode 2a, en remplaçant les acides-aminés par le tripeptide avec acides aminiques sulfurés. À 10 ml d'eau, on ajoute 1 g de vitamine C et 0,002 g de glutathione. Après 5 minutes d'agitation on introduit 1 g CHITOXAN^{MC} et on agite légèrement jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. On laisse en repos pendant 2 hrs pour arriver à l'équilibre d'hydratation. La pâte est congelée et lyophilisée. Toutes les opérations doivent se faire en l'absence de lumière.

Extraction et dosage de la vitamine C incluse dans le CHITOXAN^{MC}

15 Extraction

Solvant d'extraction : solution aqueuse d'acide métaphosphorique 3 % (w/v), 8 % acide acétique (v/v)

Méthode : Dans un tube à centrifuger de 50 ml protégé contre la lumière, on introduit de 20 jusqu'à 30 mg de CHITOXAN^{MC} + Vit. C lyophilisé et 40 ml du solvant d'extraction. Agiter pendant 60 min avec un barreau magnétique. Finalement, la suspension est centrifugée (4000 rpm) et le surnageant est analysé.

Détermination quantitative de la vitamine C

Avant de procéder à la détermination quantitative de la vitamine C, il faut mesurer le maximum d'absorption dans un spectrophotomètre UV-VIS. Le standard se prépare en utilisant une solution de vitamine C, qui a servi à la fabrication du CHITOXAN^{MC}-Vit. C, dans le solvant d'extraction. Notre test a donné un maximum d'absorption à 243 nm pour la vitamine C type ALDRICH, pureté 98 %

Après avoir évalué le maximum d'absorption, on détermine la courbe étalon (absorption en fonction de la concentration de la vitamine C). Dans une fiole jaugée, on prépare une solution de vitamine C dans le solvant d'extraction à une concentration de 1,3 mg / ml. La solution est préparée juste avant de procéder à l'analyse. Par dilution successive, on mesure la dépendance absorption / concentration (mg / ml).

La concentration du surnageant obtenu dans l'extraction est déterminée par photolorimétrie à 243 nm et calculée à partir de la courbe étalon.

La concentration de la vitamine C dans l'échantillon préparé par la méthode 2a est de 49.6%.

Inclusion du CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une base de crème

1 g de Chitoxan^{MC}-Vit. C est hydraté avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'une pâte crémeuse. Par la suite, il suffit de peser la pâte et de calculer la concentration donnée en vitamine C. Subséquemment, la pâte est introduite sous forte agitation dans la base de crème pour obtenir une concentration finale désirée en vitamine, préféablement de 5 à 25% poids.

Détermination de la stabilité de la vitamine C incluse dans une base de crème

10 g de la préparation obtenue par inclusion de CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une base crème est introduite dans un tube protégé de la lumière. Ce tube est par la suite chauffé à 45°C. Pour déterminer le taux de dégradation de la vitamine C dans la base de crème, on prend un échantillon qui correspond à environ 10 ÷ 30 mg de vitamine C. Cet échantillon est pris à chaque jour et ce pendant les 4 premiers jours et par la suite à tous les 2 jours pour un total de 30 jours. Si les échantillons ne sont pas analysés tout de suite, ils doivent être conservés au congélateur (-4°C).

Les échantillons prélevés sont analysés de la manière décrite précédemment (toujours en utilisant le solvant d'extraction).

A partir des échantillons VS2L, VS2R et VS2M on a préparé des crèmes avec une concentration de 5% à 25% poids en vitamine C. En utilisant la méthode décrite, on a trouvé une bonne stabilité de la vitamine C incluse dans le CHITOXAN: aucune coloration de la crème après un chauffage à 45 °C pendant 30 jours alors
 5 que la décomposition de la vitamine C a été de 15%. Pour une crème préparée à partir de vitamine C libre, on a trouvé, dans les mêmes conditions, une décomposition de 98% et une coloration orangée.

Cinétique de libération

Se référant au Tableau 1 ci-bas, trois types d'hydrogels CHITOXAN^{MC}-Vit. C furent
 10 étudiés. Tel qu'illustré par la figure 2, la cinétique de relargage de la vitamine C est déterminée en introduisant une quantité précise du CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans le réacteur.

Tableau 1

15	Code des préparations CHITOXAN ^{MC} -Vit. C	Degré de gonflage (α) du CHITOXAN ^{MC} (%)	Concentration de vitamine C dans le CHITOXAN ^{MC} -Vit. C (%)
	VS2L	1800	50,3
	VS2R	2200	49,6
	VS2M	3500	51,0

Le solvant (mélange 3 % w/v acide métaphosphorique et 8 % w/v acide acétique)
 20 pénètre par le tuyau central directement dans le réacteur où il entre en contact avec le CHITOXAN^{MC}-Vitamine C. La vitamine C se libère graduellement du complexe et entre en solution dans le solvant. Le solvant s'échappe du réacteur

par les petits orifices et se retrouve dans le tube extérieur. Avec cette méthode, on assure une circulation constante de solvant autour de l'échantillon à analyser.

Se référant maintenant à la figure 3, il est vu que la masse de vitamine C libérée montre une relation linéaire en fonction du temps (cinétique d'ordre zéro) avec une cassure nette après 60 minutes dans le cas du CHITOXAN^{MC}-Vit. C de type VS2L et 40 minutes dans le cas du CHITOXAN^{MC}-Vitamine C type VS2R.

Se référant maintenant à la figure 4, il est vu dans un premier cas (CHITOXAN^{MC}-Vit. C de type VS2L) que la vitamine C diffuse à une vitesse constante de 0.36 mg/min pendant la première période, puis la vitesse diminue de moitié pour les 100 minutes suivantes.

Dans le deuxième cas illustré aux figures 5 et 6 la diffusion s'effectue beaucoup plus rapidement dans les 40 premières minutes avec une vitesse de 1.18 mg/min, puis elle est presque nulle avec une valeur de 0,02 mg/min. La figure 5 montre la masse de vitamine C en fonction du temps pour l'échantillon codé VS2R. Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage (α) = 2200 %. La figure 6 montre la vitesse de libération de la vitamine C en fonction du temps pour l'échantillon codé VS2R.

La figure 7 montre la variation du pourcentage de la Vitamine C libérée en fonction du temps pour un échantillon VS2M Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C préparé à partir de CHITOXAN^{MC} avec degré de gonflage (α) = 3500 %. Pour cet échantillon, une libération de 85 % de la vitamine C dans les premiers 10 minutes d'élution fut constatée.

Inclusion du CHITOXAN^{MC}-Vit. C dans une préparation alimentaire

L'Hydrogel CHITOXAN^{MC}-Vit. C et d'autres hydrogels chitosane-xanthane contenant vitamines, acides nucléiques, acides aminés et polypeptides peuvent aussi être utilisés dans des préparations alimentaires hydratées telles que gelées, sauces, sirops, etc. ainsi que dans des préparations déshydratées.

Les caractéristiques physiques de l'hydrogel chitosane-xanthane choisi détermineront la structure et la texture plus ou moins visqueuse de l'hydrogel. Ce choix d'hydrogel selon la présente invention permettra donc d'adapter l'hydrogel à diverses applications alimentaires.

- 5 Par surcroît, la présente invention comporte la mise en pastille de la poudre CHITOXAN-Vit. C avec d'autres ingrédients actifs, si requis. Il est aussi prévu la mise en pastille d'une poudre lyophilisée d'autres hydrogels chitosane-xanthane contenant vitamines diverses, acides aminés, acides nucléiques, polypeptides ou une combinaison parmi ces ingrédients actifs.
- 10 Il va de soi que la présente demande peut recevoir aménagements et variantes sans pour autant sortir du cadre de la présente invention telle que décrite.

Les réalisations de l'invention au sujet desquelles un droit exclusif de propriété ou de privilège est revendiqué, sont définies comme suit:

1. Composition thermo et photo stable comprenant un hydrogel formé d'un complexe de xanthane et chitosane, ledit hydrogel comprenant au moins une substance thermo ou photo sensible choisie parmi les substances suivantes: vitamines, acides aminés, acides nucléiques et polypeptides, ledit hydrogel étant adapté à relarguer cesdites substances thermo ou photo sensibles chez un sujet animal ou humain.
2. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances thermo ou photo sensible sont des vitamines, préférablement dans une proportion de 5 à 25% du poids total de la composition.
3. Composition selon la revendication 2 dans laquelle les vitamines sont choisies parmi les vitamines A, B, C, D, E et K.
4. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la vitamine est la vitamine A.
5. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la vitamine est la vitamine C.

6. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances thermo et photo sensibles sont aussi liposolubles.
7. Composition selon la revendication 1 dans laquelle les substances thermo et photo sensibles sont aussi hydrosolubles.
- 5 8. Méthode de fabrication de la composition de la revendication 6 comprenant les étapes suivantes:
- (a) la dissolution des substances liposolubles dans un solvant approprié;
 - (b) l'ajout de cette solution, sous agitation, à une solution de xanthane;
 - 10 (c) la pulvérisation du mélange de l'étape (b) à une solution de chitosane;
 - (d) la récupération de l'hydrogel ainsi formé;
- toutes les étapes se faisant en l'absence d'oxygène et de lumière.
- 15 9. Méthode de fabrication de la composition de la revendication 7 comprenant les étapes suivantes:
- (a) la pulvérisation d'une solution de xanthane dans une solution de chitosane;
 - (b) la récupération de l'hydrogel ainsi formé, cette récupération
 - 20 étant caractérisée par une liophylisation de l'hydrogel;

- (c) l'introduction du l'hydrogel liophilisé dans une solution aqueuse comprenant les substances hydrosolubles;
- (d) incorporation des substances hydrosolubles dans l'hydrogel par diffusion des substances hydrosolubles lors du gonflement de l'hydrogel, ledit hydrogel ayant un degré de gonflage de 2000 % ou plus.

10. La méthode de fabrication de la revendication 9 dans laquelle, lors de l'étape (c), la stabilisation des substances hydrosolubles est favorisée par l'ajout d'acides aminiques.
- 10 11. La méthode de la revendication 10 dans laquelle les acides aminiques sont choisis parmi les L-cystéine, L-cystine et L-méthionine ou mélange de ces derniers.
12. La méthode de fabrication de la revendication 9 dans laquelle, lors de l'étape (c), la stabilisation des substances hydrosolubles est favorisée par l'ajout de tripeptides.
- 15 13. L'utilisation de la composition de l'une ou l'autre des revendications 1 à 7 dans la fabrication d'un produit dermatologique.

14. L'utilisation de la revendication 13 dans laquelle le produit dermatologique est une crème.
15. L'utilisation de la revendication 14 dans laquelle la substance thermo et photo sensible est la vitamine A.
- 5 16. L'utilisation de la composition de l'une ou l'autre des revendications 1 à 7 dans la fabrication d'un supplément alimentaire.

1/7

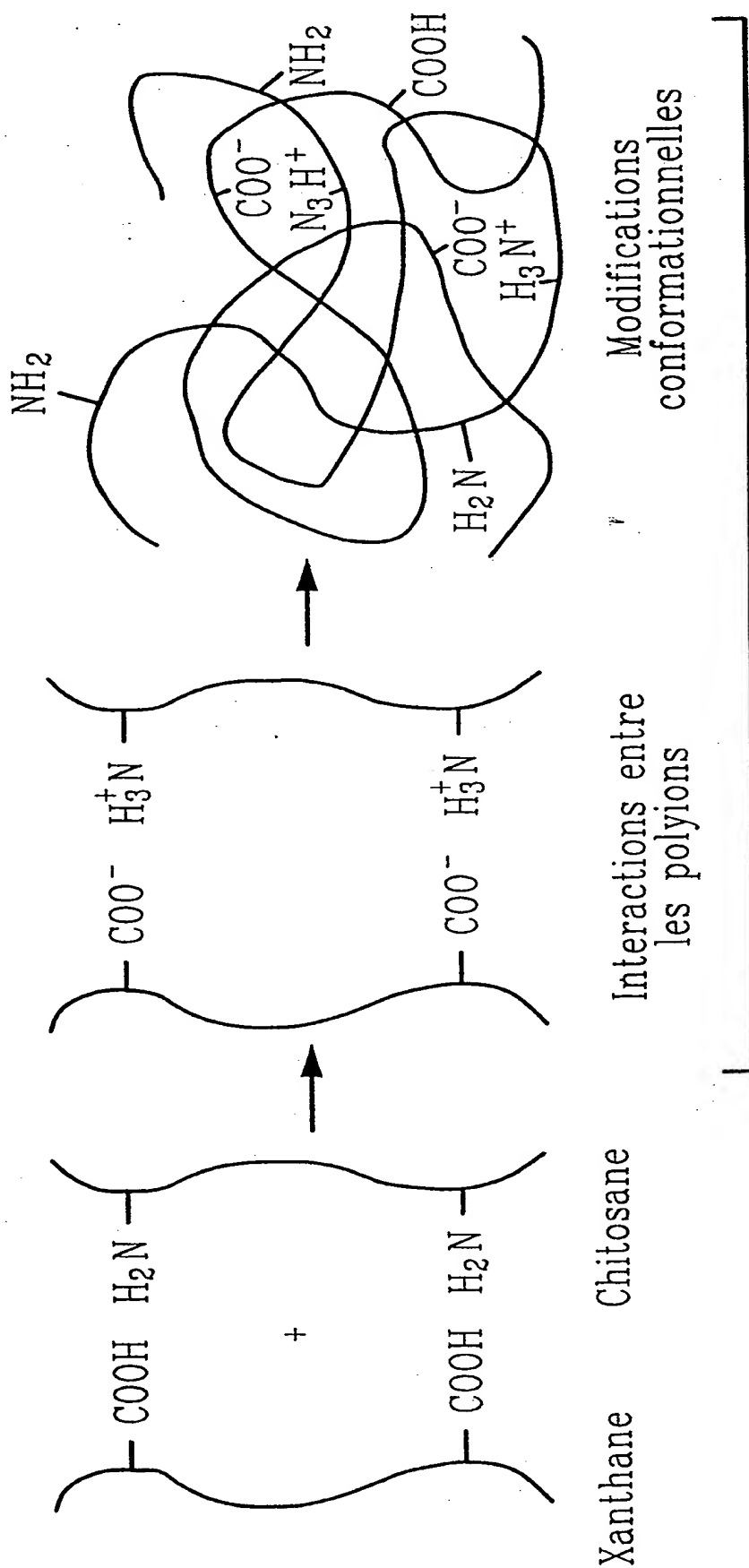
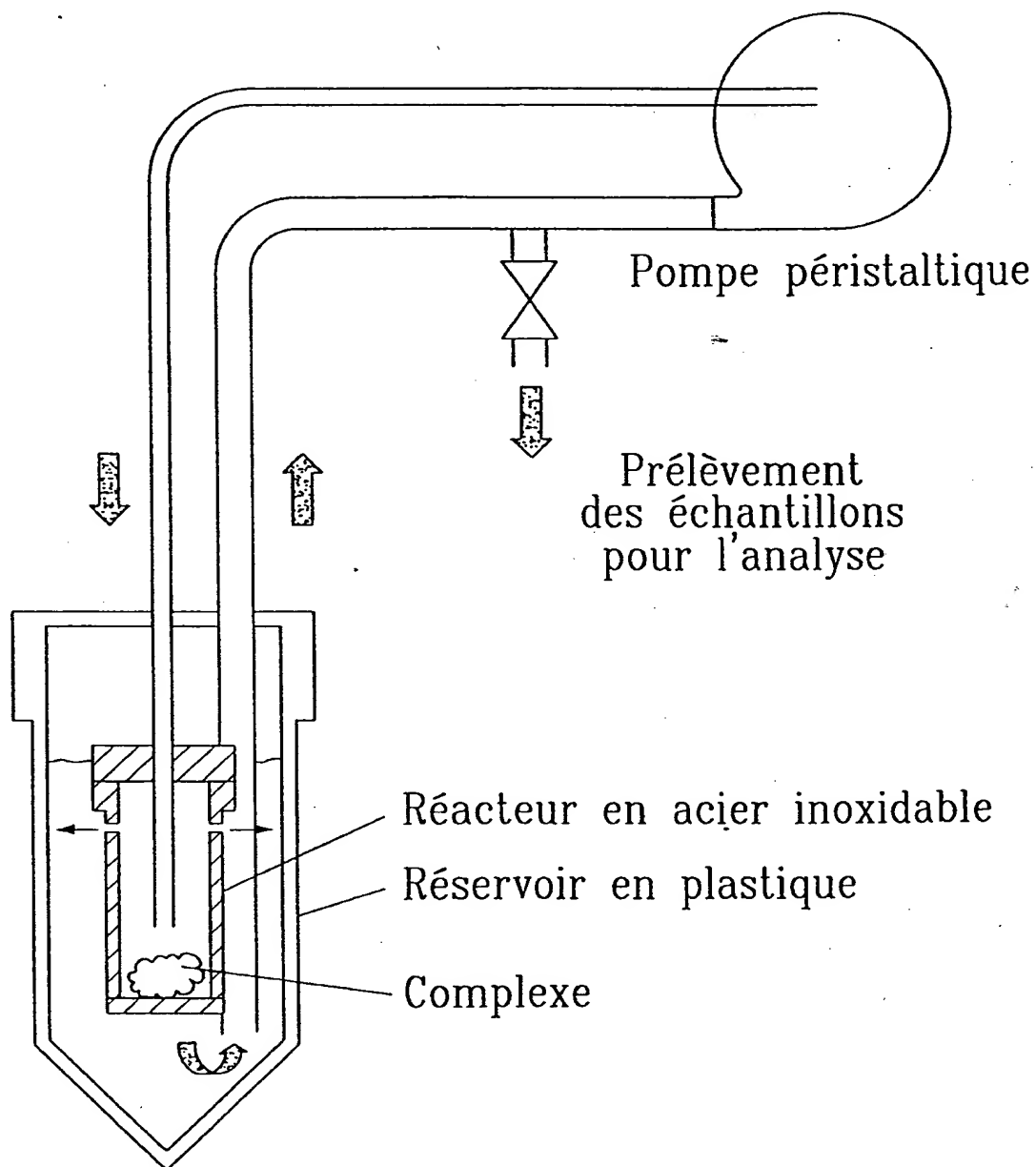
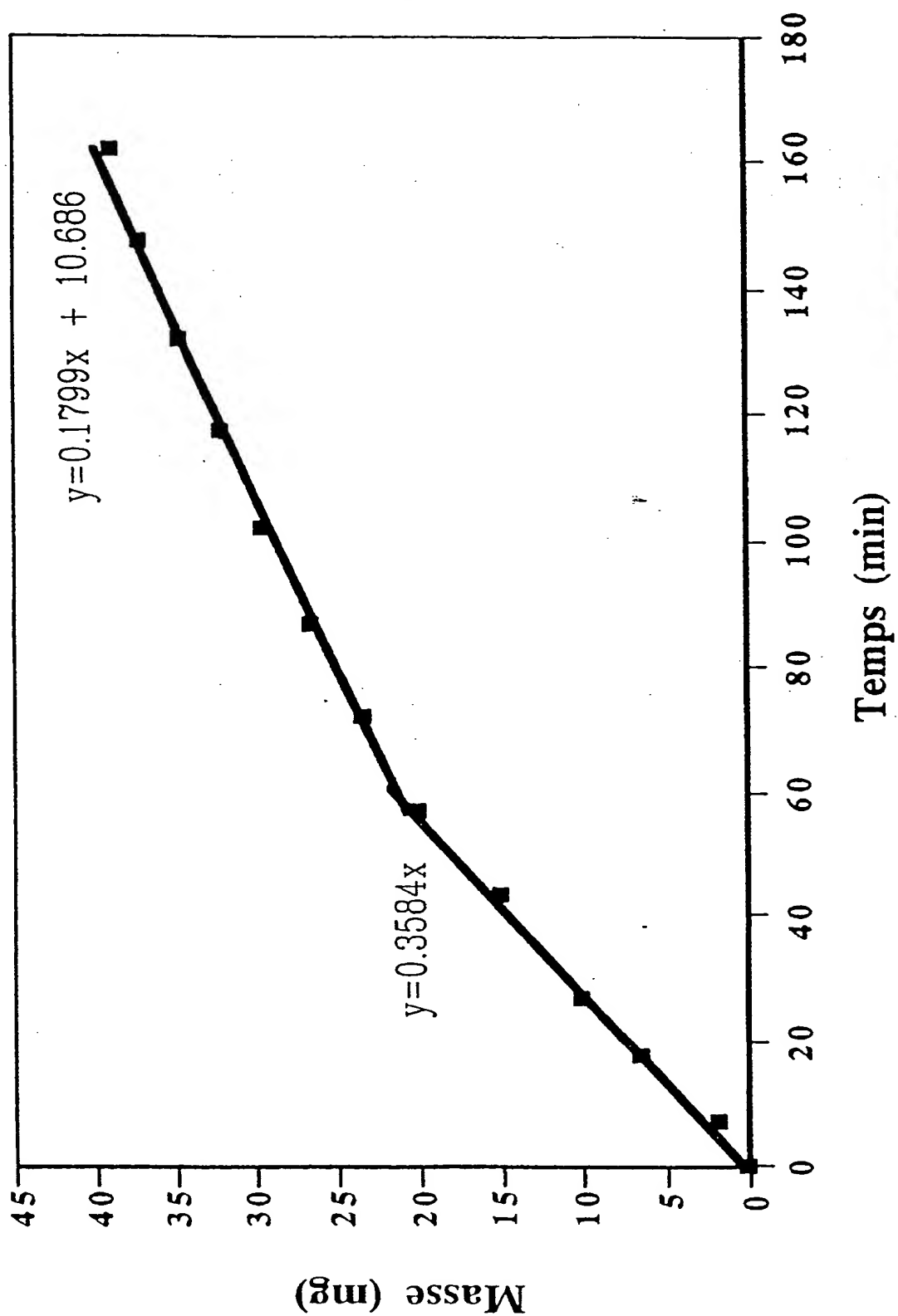


Figure 1

2/7

FIG. 2

3/7

Fig. 3

4/7

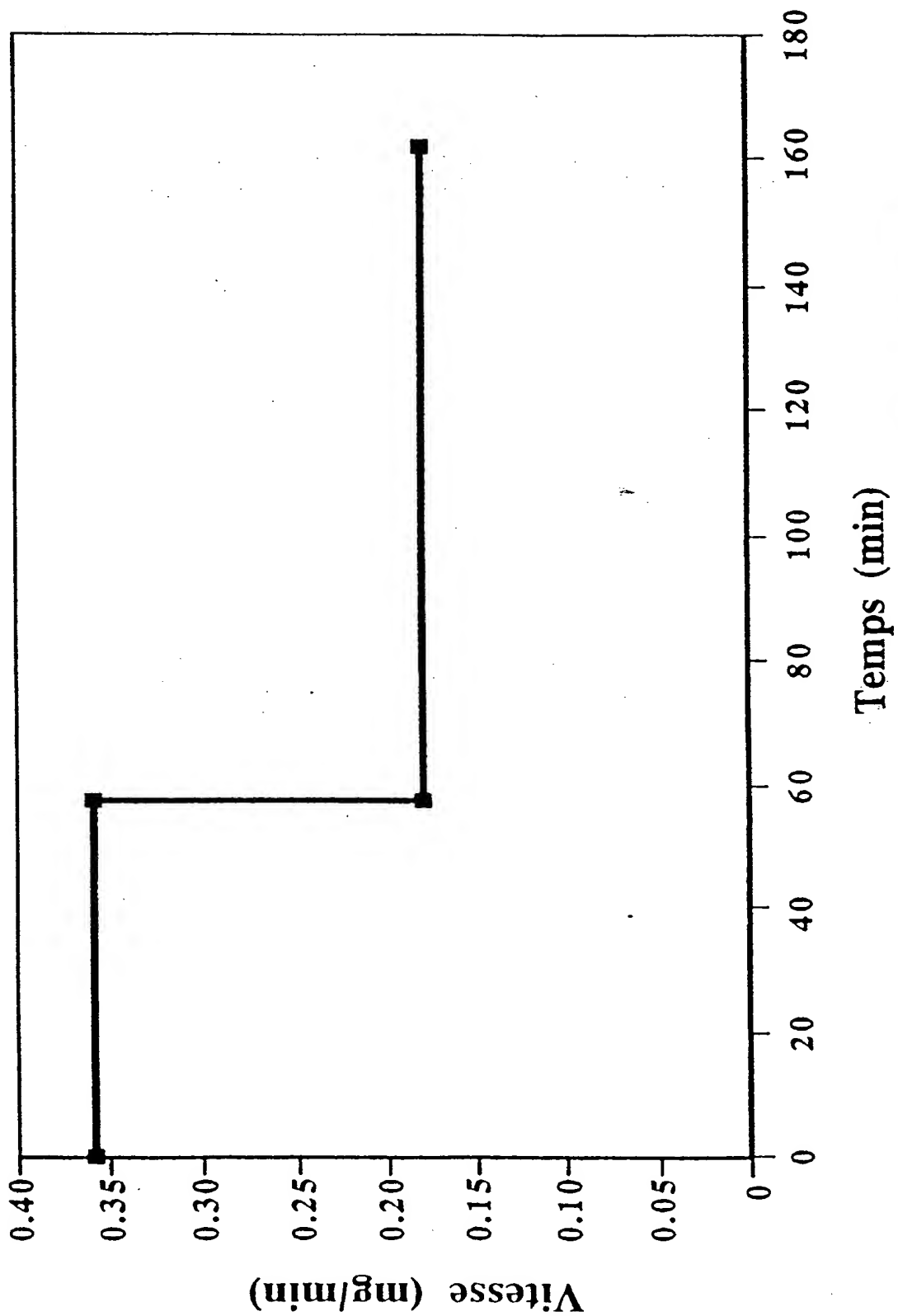
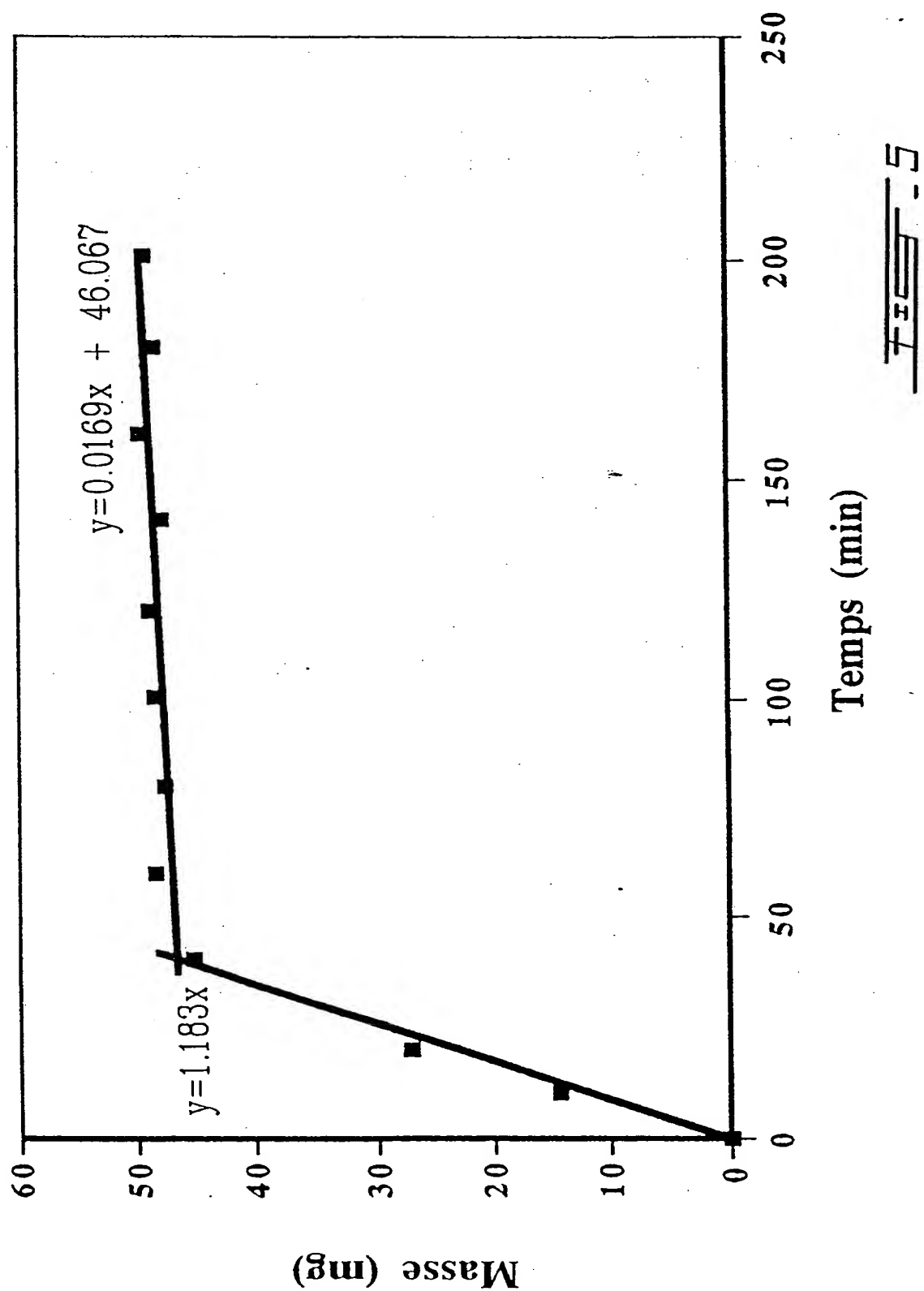


FIG. 4

5/7



6/7

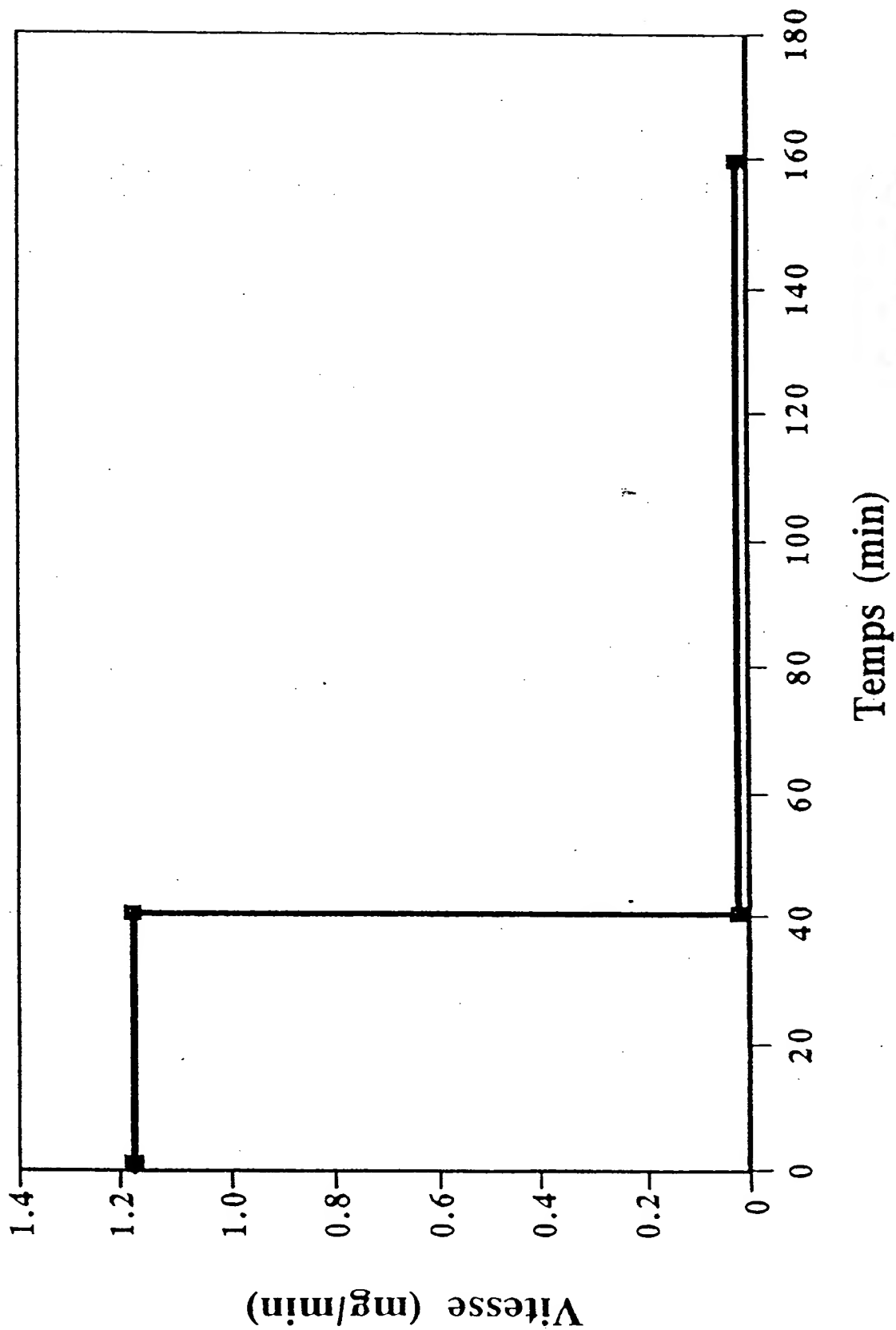


Figure 6

7/7

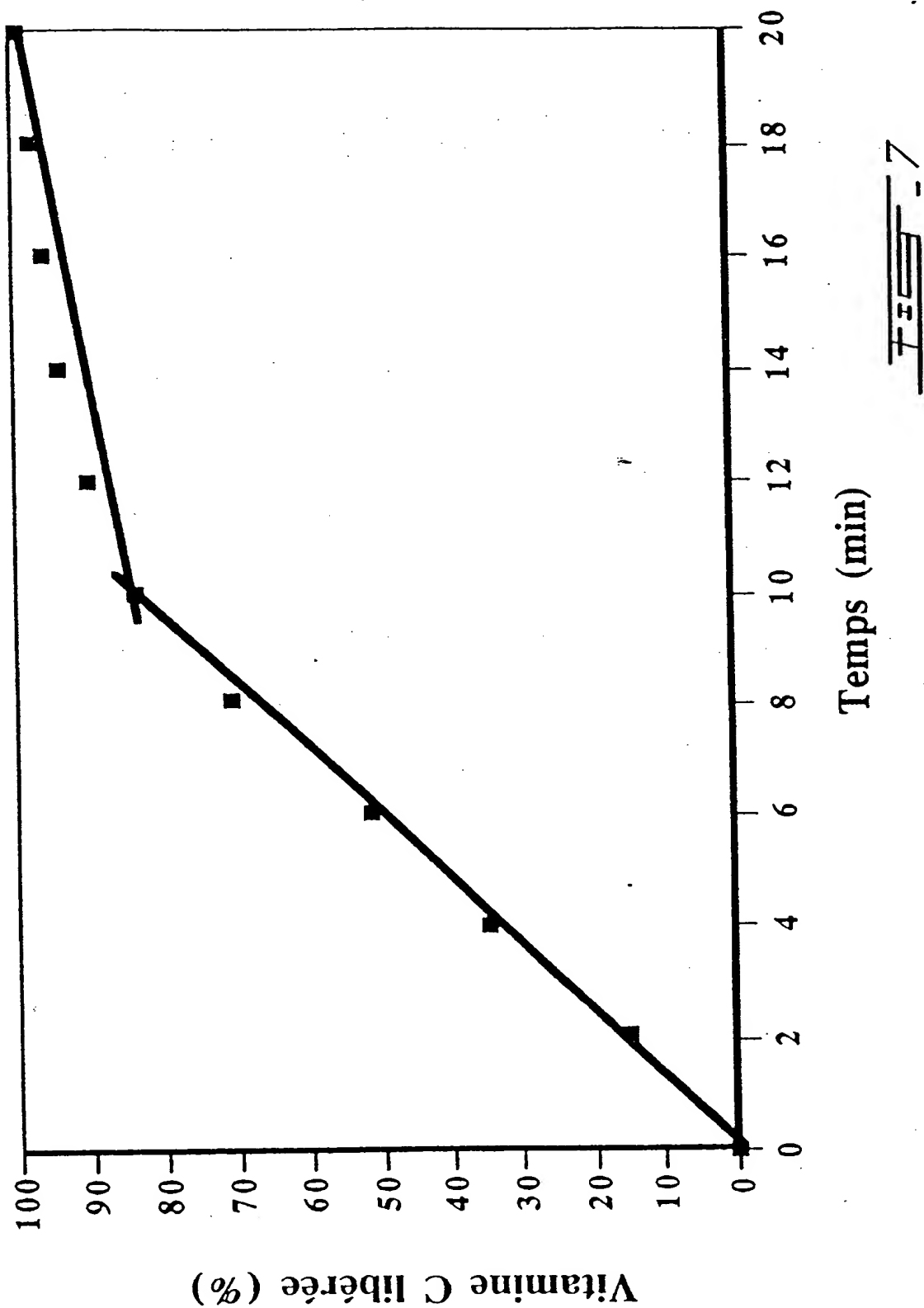


Figure 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/CA 99/00651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08L5/08 C08L5/00 A23L1/302 A23L1/303 A61K9/06
A61K31/07 A61K47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08L C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 3 833 744 A (R. A. BOMSTEIN) 3 September 1974 (1974-09-03) column 1, line 19 - line 25 column 1, line 35 - line 37 column 1, line 55 - line 59 column 2, line 67 - line 69 column 6; claims 1,5; example XII	1,16
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 21, 23 May 1994 (1994-05-23) Columbus, Ohio, US; abstract no. 268799, "Preparation of soybean protein gel" XP002116026 abstract & JP 06 022701 A (FUJI OIL CO LTD) 1 February 1994 (1994-02-01) --- -/-	1-3,5,16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 1999

Date of mailing of the international search report

05/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 99/00651

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 620 706 A (DUMITRIU ET AL.) 15 April 1997 (1997-04-15) cited in the application abstract -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 99/00651

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3833744	A	03-09-1974	NONE	
JP 06022701	A	01-02-1994	JP 2841954 B	24-12-1998
US 5620706	A	15-04-1997	CA 2148851 A	11-10-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/ CA 99/ 00651

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE IPC 7 : C08L5/08 C08L5/00 A23L1/302 A23L1/303 A61K9/06 A61K 31/07 A61K47/36 Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) IPC 7 C08L C08B Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n° des revendications visées
A	US 3 833 744 A (R. A. BOMSTEIN) 3 septembre 1974 (03.09.74) colonne 1, ligne 19- ligne 25 colonne 1, ligne 35- ligne 37 colonne 1, ligne 55- ligne 59 colonne 2, ligne 67- ligne 69 colonne 6, revendications 1,5; exemple XII	1, 16
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 21, 23 mai 1994 (23.05.94) Columbus, Ohio, US; abrégé no. 268799, " Preparation of soybean protein gel" XP002116026 abrégé & JP 06 022701 A (FUJI OIL CO LTD) 1 février 1994 (01.02.94)	1-3,5,16
A	US 5 620 706 A (DUMITRIU ET AL.) 15 avril 1997 (15.04.97) cité dans la demande abrégé	1
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents. <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe. </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités :</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, n'étant pas considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais après la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour permettre de comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche a été effectivement achevée 20 octobre 1999 (20.10.99)		Date d'expédition du rapport de recherche 5 novembre 1999 (05.11.99)
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale E.P.O n° de télécopieur		Fonctionnaire autorisé n° de téléphone

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/CA 99/00651

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 3833744 A	03-09-1974	AUCUN	
JP 06022701 A	01-02-1994	JP 2841954 B	24-12-1998
US 5620706 A	15-04-1997	CA 2148851 A	11-10-1996